



**Márcia Alexandra
Gonçalves Rato**

**Diversidade e caracterização de *Streptococcus* de
mastites de bovinos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Molecular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Ilda Santos Sanches, Professora Associada da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

Apoio financeiro/Funding:
Projecto/Project
Ref. POCTI/ESP/48407/2002 –
Fundação para a Ciência e a
Tecnologia (FCT), Portugal; FEDER.

Apoio financeiro/ Funding:
Projecto/Project
Ref. FCG PROC 60839 – Fundação
Calouste Gulbenkian, Portugal.

o júri

presidente

Doutora Maria da Conceição Lopes Vieira dos Santos
Professora Associada da Universidade de Aveiro

Doutora Ilda Santos Sanches
Professora Associada da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Doutora Lélia Mariana Marcão Chambel
Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

agradecimentos

- À Professora Doutora Ilda Santos-Sanches, responsável pelo Laboratório de Genética Molecular de Procariontes da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, minha orientadora neste projecto, no âmbito da Tese de Mestrado, por todo o seu apoio, orientação e por tudo o que me ensinou.
- À Dora Rolo, ao Renato Pires e ao Luís Sobreira a quem agradeço pelo apoio e atenção durante o trabalho experimental.
- À Professora Doutora Cristina Vilela, ao Dr. Ricardo Bexiga, ao Sandro Nunes, e a Lina Cavaco do Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, (CIISA), Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa, pela colaboração em alguns dos estudos desta Tese.
- À Professora Doutora Filomena Exposto e à Filipa Nogueira da Unidade de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST), Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, por nos terem facultado resultados não publicados e pela colaboração em alguns dos estudos desta Tese.
- Ao Professor Doutor Rogério Tenreiro, Tania Tenreiro e Sandra Chaves do Instituto de Ciência Aplicada e Tecnologia, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, pela colaboração na elaboração dos dendrogramas.
- Ao Dr. Gillian Pullinger, o gestor da base de dados pública de *Streptococcus uberis*, (pubmlst.org/suberis) pela submissão de sequências e por ter incluído os novos alelos e sequências-tipo na base de dados de *S. uberis*.
- À Professora Doutora Isabel Spencer-Martins, coordenadora do Centro de Recursos Microbiológicos e responsável pela Secção Autónoma de Biotecnologia, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, pelo apoio dado durante a realização deste trabalho.



Márcia Alexandra
Gonçalves Rato

Diversidade e caracterização de *Streptococcus* de mastites de bovinos

palavras-chave

mastite subclínica bovina, epidemiologia molecular, fenótipos e genótipos de resistência a antimicrobianos, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*.

resumo

Streptococcus agalactiae (*Streptococcus* do grupo B, ou GBS), *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (*Streptococcus* do grupo C, ou GCS) e *Streptococcus uberis*, são agentes patogénicos frequentemente associados a mastite subclínica em bovinos. Esta doença causa avultados prejuízos económicos em explorações de bovinos leiteiros, devido a perdas na produção de leite e utilização de antimicrobianos em terapia. No entanto, a epidemiologia e a estrutura da população destes microrganismos ainda não são conhecidas em Portugal e são importantes para desenvolver programas mais adequados de terapêutica e controlo da doença. Este estudo incidiu na caracterização da resistência a antimicrobianos, clonalidade e virulência, de estirpes de campo GBS ($n=32$), GCS ($n=17$) e *S. uberis* ($n=30$) recolhidas de bovinos leiteiros em 11 explorações do Ribatejo-Oeste, Portugal, de 2002 a 2003. Cerca de 23% dos isolados das três espécies são resistentes à eritromicina e pirlimicina, ou seja, de fenótipo cMLS_B (resistência constitutiva a macrólidos, lincosamidas e estreptograminas B). Isolados de GCS (12%) e *S. uberis* (31%) apresentam resistência à pirlimicina e susceptibilidade à eritromicina, o que sugere um novo fenótipo de susceptibilidade a macrólidos e resistência a lincosamidas e estreptograminas A (fenótipo LSA), descrito em isolados GBS de origem humana. Todos os isolados MLS_B, contêm o gene de resistência a macrólidos *erm*(B) e não *erm*(A), nem *mef*(A), excepto um isolado GCS que é *erm*(A)⁺*erm*(B)⁻*mef*(A)⁻. A resistência à tetraciclina foi muito elevada (60-100%) em todas as espécies. O gene *tet*(O) foi o mais frequentemente detectado (61%) nos isolados resistentes à tetraciclina, seguido de *tet*(K), (38%), *tet*(M), (27%) e *tet*(S), (16%). Em nenhum isolado foi encontrado *tet*(T), *tet*(W), *tet*(L) ou *tet*(Q). Todos os isolados apresentaram susceptibilidade à vancomicina e ao cloranfenicol. O gene de virulência *speC*, codificado por um genoma fágico de *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* do grupo A, GAS), um agente patogénico humano, foi detectado em 29,4% dos isolados GCS, o que indica que os fagos podem contribuir para a diversidade genética e virulência de GCS de bovinos. Os padrões electroforéticos de restrição do DNA bacteriano com *Sma*I (PFGE) revelaram 20 tipos clonais de GBS, 29 de *S. uberis* e 14 de GCS (o DNA de um isolado não foi fragmentado pela *Sma*I). Esta análise revelou um maior grau de polimorfismo intra-espécies em *S. uberis* e GCS, do que em GBS. A maior parte dos clones identificados são específicos da exploração de origem. Dois isolados GCS de explorações distintas apresentam padrões de restrição idênticos. Dois clones putativos (um de serótipo V e outro de serótipo III) foram observados em isolados GBS de origem humana e bovina. Nos isolados *S. uberis*, testados por sequenciação de múltiplos *loci* (MLST), foram identificados seis novos perfis alélicos (ST), cinco dos quais com sete alelos novos, o que representa novas estruturas genómicas em *S. uberis*. Um dos ST pertence a um complexo clonal que inclui isolados na maioria da Nova Zelândia. Em GBS, foram encontrados dois ST relacionados (variação de um ou dois *loci*) com ST de origem humana.



Márcia Alexandra
Gonçalves Rato

Diversidade e caracterização de *Streptococcus* de mastites de bovinos

keywords

subclinical bovine mastitis, molecular epidemiology, antimicrobial resistance phenotypes and genotypes, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*.

abstract

Streptococcus agalactiae (Group B *Streptococcus*, GBS), *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (Group C *Streptococcus*, GCS) and *Streptococcus uberis* are pathogens causative of bovine mastitis, a highly prevalent and costly disease in dairy industry due to antibiotherapy and loss in milk production. However, the molecular characterization of field *Streptococcus* spp. isolates occurring in Portugal is still not known and is important to improve therapeutic and disease control programs. The aim of this study was to document the molecular epidemiology, antimicrobial resistance and virulence traits of field isolates of GBS ($n=32$), GCS ($n=17$) and *S. uberis* ($n=30$) collected from bovine subclinical mastitis in 11 dairy farms of the region Ribatejo-Oeste, Portugal, from 2002 to 2003. Cross-resistance to erythromycin and pirlimycin was found in all species, corresponding to the MLS_B phenotype (resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin B). Isolates of GCS and *S. uberis* resistant to pirlimycin and susceptible to erythromycin were detected, suggesting the new LSA phenotype (susceptibility to macrolide, resistance to lincosamide and streptogramin A) recently described in human GBS. All MLS_B isolates carry the *erm(B)* gene and not *erm(A)* or *mef(A)*, except one GCS isolate of genotype *erm(A)*⁺*erm(B)*⁻*mef(A)*⁻. Resistance to tetracycline was found to be very high (60-100%) in all species. The *tet(O)* gene was the most prevalent (61%) among the tetracycline resistant isolates, followed by *tet(K)*, (38%), *tet(M)*, (27%) and *tet(S)*, (16%). The following genes were not detected: *tet(T)*, *tet(W)*, *tet(L)* and *tet(Q)*. Susceptibility to vancomycin and chloramphenicol was observed in all isolates. The phage-encoded virulence gene *speC* of the human pathogen *Streptococcus pyogenes* (Group A *Streptococcus*, GAS) was detected in 29,4% of GCS isolates, suggesting that prophages may also be critical contributors to the genetic diversity and virulence of bovine GCS. *Sma*I-macro-restriction profiles of bacterial DNA (PFGE) revealed 20 clonal types of GBS, 29 of *S. uberis* and 14 of GCS (one isolate was uncut by *Sma*I). This analysis showed a greater degree of intra-species polymorphism for *S. uberis* and GCS than for GBS. Most clones were herd-specific, although two GCS isolates with identical restriction patterns were from distinct farms. Two putative clones of serotypes III and V were identified among bovine and human GBS. The *S. uberis* isolates analyzed by sequencing of multiple *loci* (MLST) were shown to have six novel allelic profiles (ST). Five of these new ST have seven novel alleles. One ST was assigned to a major clonal complex recently detected among bovine isolates from New Zealand mostly. These data represent novel genomic backgrounds of this pathogen. The bovine GBS were resolved in two ST which are closely related (one or two *loci*-variant) with ST of human GBS.

Índice

Introdução

Definição de mastite bovina	1
Agentes etiológicos de mastite bovina	1
Impacte das mastites bovinas na indústria leiteira e saúde pública	3
Resistência a antibióticos em agentes patogénicos de mastites	5
Breve descrição do género <i>Streptococcus</i> e das espécies <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> e <i>Streptococcus uberis</i>	6
Tipagem e caracterização molecular de isolados de <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> e <i>Streptococcus uberis</i>	9
<i>Electroforese em campo pulsado (Pulsed-field gel electrophoresis – PFGE)</i>	10
<i>Multilocus sequence typing (MLST)</i>	10
Mecanismos de resistência a antimicrobianos relevantes para este estudo	11
Factores de virulência em <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> , relevantes para este estudo	12
Enquadramento e Objectivos do estudo	14

Materiais e Métodos

1. Meios de cultura, tampões, soluções, enzimas e dNTPs, agaroses, antimicrobianos, padrões de massa molecular de DNA, sistemas comerciais e equipamentos	15
2. Origem dos isolados de <i>Streptococcus</i> spp.	21
3. Estirpes bacterianas utilizadas como controle	21
4. Conservação dos isolados	23
5. Identificação de serogrupos de Lancefield (Slidex® Strepto Kit, bioMérieux®, Marcy l'Etoile, France)	23
6. Teste CAMP (Christie, Atkins e Munch-Petersen)	24
7. Teste de aglutinação para identificação de serótipos em <i>Streptococcus agalactiae</i> (GBS Serotyping Kit, ESSUM Probiotics, Suécia)	24
8. Electroforese em Gel de Agarose por Campo Pulsado ("Pulsed Field Gel Electrophoresis", PFGE)	25
8.1. Propagação das culturas	25
8.2. Lavagem celular e ajuste da concentração celular	26
8.3. Preparação de discos de agarose	26
8.4. Lise celular	27
8.5. Desproteinização	27
8.6. Lavagem dos discos de agarose	27
8.7. Restrição do DNA em discos de agarose com as endonucleases <i>Sma</i> I e <i>Sfi</i> II	27
8.8. Paragem da restrição do DNA	28
8.9. Preparação do gel de agarose para PFGE e aplicação dos discos de DNA nos poços do gel	28
8.10. Coloração do gel e fotografia da imagem do gel	28

9. Elaboração de dendrogramas	28
10. Determinação de perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos por difusão em disco (Antibiogramas) e determinação de concentrações mínimas inibitórias (“Minimum Inhibitory Concentration”, MIC) pelo método de microdiluição	29
10.1. Determinação de perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos por difusão em disco (Antibiogramas)	31
10.2. Método de avaliação de fenótipos de resistência a macrólidos - Teste do duplo disco	34
10.3. Determinação de concentrações mínimas inibitórias (MIC) pelo método das microdiluições	36
11. Pesquisa de genes associados à resistência aos antimicrobianos e genes associados à virulência em <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> e <i>S. uberis</i> , por PCR	38
11.1. Isolamento de DNA para pesquisa por PCR de genes de resistência a antimicrobianos e genes de virulência	38
11.2. Condições de reacção de amplificação e sequências iniciadoras	39
11.3. Visualização dos amplicões	42
12. “Multi-locus Sequence Typing” (MLST) de <i>Streptococcus agalactiae</i> e <i>Streptococcus uberis</i>	43
12.1. Isolamento de DNA para amplificação de genes nativos ou “housekeeping” para MLST	44
12.2. Condições de reacção de amplificação por PCR de genes nativos ou “housekeeping” para MLST	45
12.3. Visualização das amplificações	47
12.4. Purificação dos amplicões para sequenciação	47
12.5. Visualização dos amplicões após a purificação para sequenciação	48
12.6. Análise de sequências para determinação do perfil alélico	48

Resultados

1. Características dos isolados de <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> e <i>Streptococcus uberis</i>	49
2. Teste de aglutinação para identificação de serótipos em <i>Streptococcus agalactiae</i>	49
3. Susceptibilidade a agentes antimicrobianos e fenótipos de resistência a macrólidos em <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> e <i>Streptococcus uberis</i>	50
4. Genótipos de resistência a macrólidos e tetraciclina em <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> e <i>Streptococcus uberis</i>	52
5. Pesquisa de genes de virulência por PCR em <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	56
6. Tipagem molecular por Electroforese em Gel de Agarose por Campo Pulsado (PFGE, “Pulsed Field Gel Electrophoresis”)	56
Perfis de PFGE de <i>S. agalactiae</i>	57
Perfis de PFGE de <i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	59
Perfis de PFGE de <i>S. uberis</i>	61
7. <i>Multi-locus Sequence Typing</i> - MLST em <i>Streptococcus agalactiae</i> e <i>Streptococcus uberis</i>	64
8. Dendrogramas e associação entre <i>clone</i> , fenótipos e genótipos de <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> e <i>S. uberis</i> isolados de bovinos.	67
9. Dendrograma de perfis electroforéticos de isolados <i>Streptococcus agalactiae</i> de origem bovina e <i>Streptococcus agalactiae</i> de origem humana	71

Discussão	73
1. Estudo da susceptibilidade aos antimicrobianos e fenótipos de resistência a macrólidos em <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> e <i>Streptococcus uberis</i>	74
2. Pesquisa de genes de virulência em <i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	78
3. Serotipagem em <i>S. agalactiae</i>	78
4. Caracterização molecular de <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> e <i>Streptococcus uberis</i>	79
4.1. <i>S. agalactiae</i>	80
4.2. <i>S. uberis</i>	80
4.3. <i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	81
Conclusões	82
Perspectivas futuras	84
Bibliografia	85
Anexos	
Anexo 1. Comunicações em Congressos	97
Anexo 2. Artigo submetido para publicação	98
Anexo 3. Plano de trabalho para a Tese de Doutorado	99

Alguns dos resultados obtidos no âmbito desta Tese de Mestrado foram incluídos em duas Comunicações em Congressos e num artigo submetido para publicação:

Comunicações em Congressos:

M. Rato, D. Rolo, R. Bexiga, S. F. Nunes, L. M. Cavaco, F. Nogueira, F. Exposto, C. L. Vilela, I. Santos-Sanches. 2005. Antimicrobial Resistant Traits and Molecular Epidemiology of Streptococci from Bovine Mastitis. 7th European Congress of Chemotherapy and Infection, Florence, Italy, October 19-22, 2005. (<http://www.oic.it/ecc2005/>).

R. Bexiga, M. Rato, S. F. Nunes, D. Rolo, L. M. Cavaco, I. Santos-Sanches, C. L. Vilela. 2005. Antimicrobial Resistance Phenotypes and Genotypes of Streptococci isolated from Bovine Subclinical Mastitis. Congresso Nacional MICRO'05-BIOTEC'05. Póvoa do Varzim, Portugal. Novembro 30 – Dezembro 3, 2005. (<http://www.microbiotec2005.info/>).

Artigo submetido para publicação:

M. Rato, Bexiga R., Nunes S. F., Cavaco L. M., Vilela C. L., Santos-Sanches I. Molecular Epidemiology and population structure of bovine *Streptococcus uberis* isolates from Portuguese dairy farms. Appl. Environ. Microbiol. AEM00788-06.

INTRODUÇÃO

Definição de mastite bovina

As mastites de bovinos leiteiros são infecções intra-mamárias, de um ou mais quartos do úbere da vaca, devido à presença de microrganismos patogénicos que provocam inflamação ao nível da glândula mamária e modificam o aspecto e composição do leite, assim como a quantidade de leite produzido. A via de entrada dos agentes patogénicos é pelo canal do teto, onde se multiplicam, degradando os tecidos celulares. Quando atingem o epitélio secretor, a destruição total ou parcial deste não permite a regeneração celular, provocando uma diminuição na produção de leite. As mastites favorecem o desenvolvimento de componentes indesejáveis do leite, diminuindo os componentes qualitativos, contribuindo para a diminuição da qualidade do leite (Seegers *et al.*, 2003).

Os sintomas de uma mastite dependem do grau de reacção do úbere perante a infecção. A mastite pode ser subclínica ou clínica. A forma subclínica não se detecta visualmente, porque o leite permanece visualmente inalterado e o úbere não apresenta exteriormente qualquer sintoma da doença. Pode ser detectada pelo teste californiano de mastites (TCM), ou pela contagem de células leucocitárias no leite, pois a resposta inflamatória devido à infecção promove um aumento nas contagens de células leucocitárias.

A forma clínica de mastite bovina é caracterizada por sintomas visíveis, nomeadamente alteração da cor e textura do leite e úbere avermelhado, quente e doloroso e eventualmente febre e falta de apetite do animal afectado. Esta forma de mastite manifesta-se ainda pela presença de elevado número de células leucocitárias no leite, particularmente de valores acima de 250000 células/ml (Leigh, 1999).

A mastite bovina subclínica, embora seja menos grave fisiologicamente do que a mastite clínica, é mais frequente e representa um maior risco de contaminação para outros animais, uma vez que a sua detecção é difícil. Consequentemente, as formas subclínicas de mastite apesar de menos evidentes para o produtor que as clínicas, são as que mais afectam o rendimento económico da exploração leiteira.

Agentes etiológicos de mastite bovina

Diversos autores têm documentado a prevalência e distribuição de agentes patogénicos responsáveis por mastite em bovinos leiteiros.

No Reino Unido, a maior parte dos casos de mastite devem-se a cinco espécies de bactérias que representam cerca de 80% dos diagnósticos: *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *Streptococcus agalactiae* (Anon, 2001, citado em Bradley, 2002).

Na Nova Zelândia os agentes etiológicos mais comuns associados a mastite clínica e subclínica de bovinos são *S. uberis* (cerca de 30%) e *S. aureus* (37%) (Douglas *et al.*, 2000).

Nos Estados Unidos verifica-se que os agentes patogénicos associados a mastites mais frequentes são *S. aureus* (9,7%), *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos (13,22%), *S.*

agalactiae (4,16%), outros *Streptococcus* spp. (12,23%) e ainda *E. coli* (4%), *Klebsiella* spp. (1,2%) e *Corynebacterium bovis* (2,73%) (Makovec & Ruegg, 2003).

S. aureus, *S. agalactiae* e *Corynebacterium* spp. são agentes patogénicos associados a mastites bovinas considerados de contágio. *S. uberis* e *E. coli* são considerados agentes patogénicos de natureza ambiental.

A aplicação de medidas higiénicas de controlo nos últimos 20 anos, mostraram ser eficientes contra agentes patogénicos de contágio, como *S. agalactiae* e *S. aureus*. No entanto, estas medidas não foram eficientes contra agentes patogénicos ambientais como *S. uberis* (Leigh, 1999). De facto, Makovec & Ruegg (2003), observaram um decréscimo no isolamento de *S. aureus* e de *S. agalactiae* em vacas com mastites entre 1994 e 2001 nos Estados Unidos. De todos os agentes etiológicos de mastites bovinas, *S. aureus* passou de 17,7% em 1994 para 9,7% em 2001 e *S. agalactiae* passou de 8,1% em 1994 para 3% em 2001 (Makovec & Ruegg, 2003). De todos os isolados, *Streptococcus* spp. de natureza ambiental passaram de 11,6% para 20% (Makovec & Ruegg, 2003).

Tem-se verificado o aumento da prevalência dos agentes patogénicos ambientais, particularmente de *S. uberis* em Países como o Reino Unido e Nova Zelândia (Douglas *et al.*, 2000; Leigh, 1999), onde se aplicam medidas rigorosas de higiene.

Em contraste, em estudos recentes no Brasil foi observada a alta prevalência de *S. aureus* (19,2%), *S. agalactiae* (6,9%) e *Corynebacterium* spp. (55,2%) associados a mastites bovinas, o que parece mostrar que as medidas higio-sanitárias de controle para as mastites consideradas contagiosas não são aplicadas correctamente no Brasil (Brito *et al.*, 1998; Brito *et al.*, 1999).

A prevalência e distribuição dos agentes patogénicos responsáveis por mastite em bovinos leiteiros em Portugal foram documentadas recentemente (Bexiga *et al.*, 2005). Observou-se que os agentes microbianos mais frequentemente associados a esta doença são *S. agalactiae* (13,9% das amostras), *Staphylococcus epidermidis* (8,3%), *S. aureus* (7,8%), *S. uberis* (7,4%) e *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (2,8%) e ainda *Corynebacterium* spp. (12,4% das amostras) e a alga unicelular *Prototheca* spp. (1,7%).

De acordo com alguns estudos, incluindo o estudo nacional acima referido, as espécies de *Streptococcus* mais relevantes em mastite bovina incluem os agentes contagiosos *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *S. uberis*. Foram estas três espécies as estudadas no âmbito deste trabalho.

S. agalactiae, *Streptococcus* do Grupo B (Group B *Streptococcus* - GBS), frequentemente associado a casos de mastite em bovinos de leite, é considerado um agente patogénico de contágio (Blowey & Edmondson, 1995), ou seja, sobrevive no hospedeiro, em particular na glândula mamária da vaca, sendo capaz de estabelecer infecções subclínicas e clínicas da doença e transmitindo-se tipicamente de animal em animal e/ou provavelmente durante o processo de ordenha (Radostits *et al.*, 1994).

S. agalactiae é também responsável por uma série de infecções em humanos (Schuchat *et al.*, 2000) e a causa mais comum de sépsis neonatal, uma infecção grave em recém-nascidos (Schuchat, 1998).

A melhor forma de controlar este patógeno nos casos de mastite bovina é investir na prevenção, implementando regras de higiene na exploração.

S. dysgalactiae subsp. *dysgalactiae*, *Streptococcus* do Grupo C (Group C *Streptococcus* - GCS) é um dos agentes patogénicos mais frequentemente associados a mastites, clínicas e subclínicas. É considerado um agente patogénico de natureza ambiental (Smith & Hogan, 1993; Todhunter *et al.*, 1995) mas também de contágio (Leigh, 1999). Ainda poucos estudos foram realizados acerca da sua epidemiologia e patogenicidade. Sabe-se, no entanto, que foi isolado de moscas como a *Hydrotaea irritans*, que habitam o ambiente dos bovinos leiteiros (Bramley *et al.*, 1985; Madsen *et al.*, 1991).

S. uberis é um dos agentes patogénicos mais frequentemente associados a mastites subclínicas e clínicas de bovinos de leite, em vacas em lactação ou em período de secagem (Bradley, 2002; Todhunter *et al.*, 1995). *S. uberis* é um agente patogénico de natureza ambiental, ou seja, o principal reservatório deste microrganismo é o ambiente onde as vacas vivem (Leigh, 1999). Uma das razões apontadas para a dificuldade em controlar mastites causadas por *S. uberis*, agente patogénico de natureza ambiental, é o facto de pouca informação estar disponível sobre este agente patogénico, particularmente sobre a sua epidemiologia e patogenicidade (Leigh, 1999). Tem sido evidenciada a necessidade de vacinação dos animais contra a mastite causada por *S. uberis* (Fontaine *et al.*, 2002; Leigh, 1999; Leigh *et al.*, 1999).

Impacte das mastites bovinas na indústria leiteira e saúde pública

A mastite é considerada a patologia que causa o maior prejuízo em explorações de bovinos leiteiros (Erskine *et al.*, 2003; Seegers *et al.*, 2003). Estes prejuízos resultam da diminuição da produção de leite e da sua qualidade, sendo esta perda de valor atribuída aos produtores pela indústria transformadora do leite (Seegers *et al.*, 2003).

As mastites constituem a razão mais frequente para o uso de antibióticos em bovinos leiteiros (Erskine *et al.*, 2003; Gruet *et al.*, 2001; Guérin-Faubleé *et al.*, 2002) o que constitui custos económicos elevados.

Na última década tem sido documentada o aumento de resistência a antimicrobianos por parte de agentes patogénicos de origem humana, em meio hospitalar e também em agentes patogénicos de origem animal em produção animal (Witte, 1998).

Actualmente, as estratégias de tratamento terapêutico utilizando antimicrobianos em casos de mastites bovinas, têm tido níveis de cura muito baixos, particularmente em relação a alguns agentes patogénicos que são responsáveis por infecções crónicas (Gruet *et al.*, 2001).

Em Portugal, a terapia empírica como abordagem de tentativa e erro, de forma arbitrária, no uso de quimioterápicos, poderá contribuir para a emergência de resistências a agentes antimicrobianos importantes em termos de saúde pública, sendo também contraproducente em termos de saúde do úbere da vaca e em termos económicos (Bexiga *et al.*, 2005).

Desta forma, o conhecimento do perfil de susceptibilidade aos agentes patogénicos responsáveis pelas mastites em bovinos leiteiros, é fundamental na escolha do antimicrobiano a adotar para terapia e controlo da doença (Erskine *et al.*, 2003; Seegers *et*

al., 2003). Por outro lado, a vigilância epidemiológica contínua da susceptibilidade aos antimicrobianos para estes microrganismos, permite monitorizar o aparecimento de estirpes microbianas resistentes a alguns antibióticos. Acresce ainda o facto de que os padrões de resistência aos antimicrobianos utilizados em mastites poderem variar entre países, e até mesmo entre explorações, não devendo ser extrapolados (Vintov *et al.*, 2003).

A antibioterapia utilizada em animais de produção, como é o caso dos bovinos leiteiros, tem sido considerada como catalizadora do aumento de resistências em isolados bacterianos (Piddock, 1996; White & McDermott, 2001; Witte, 1998). Com efeito, a resistência a antimicrobianos em agentes patogénicos em produção animal é um problema de saúde animal, mas também tem sido alvo de debate, devido ao facto de poder ter implicações na saúde humana (Witte, 1998).

Tem sido documentada a transferência da resistência aos antimicrobianos entre bactérias. A interacção entre elementos de transferência de genes de resistência pode aumentar a capacidade de transferência desses genes (Salyers & Amábile-Cuevas, 1997). Elementos responsáveis pela dispersão de genes de resistência a antimicrobianos, incluem plasmídeos com capacidade de replicação autónoma e transposões que podem transportar genes de resistência de cromossomas para plasmídeos e vice-versa (Salyers & Amábile-Cuevas, 1997). A conjugação e transferência de plasmídeos com determinantes de resistência a antimicrobianos é um fenómeno que ocorre naturalmente no meio ambiente e que pode ocorrer entre estirpes de bactérias de origem humana ou animal, mesmo na ausência de antibióticos (Kruse & Sørum, 1994). A contaminação do ambiente com bactérias patogénicas resistentes a agentes antimicrobianos representa uma ameaça, não só porque podem provocar doenças, mas também porque constitui uma fonte de plasmídeos que transportam vários determinantes de resistência a antimicrobianos, que podem facilmente ser transferidos para outras bactérias de origens diversas (Kruse & Sørum, 1994). Transposões conjugativos podem também ser responsáveis por transferência de genes de resistência a antimicrobianos em diversas espécies de bactérias (Clewell *et al.*, 1995; Salyers *et al.*, 1995).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos tornou-se um problema no mundo inteiro e têm sido descritos vários mecanismos de resistência aos antibióticos. Determinantes de resistência aos antibióticos em agentes patogénicos de origem animal têm sido documentados. Por exemplo, genes de resistência à tetraciclina *tet*(O), *tet*(L) e *tet*(K) foram observados em *Streptococcus* spp. associados a mastites bovinas (Brown & Roberts, 1991). Foi também observado neste estudo que o determinante *tet*(O) é mediado por plasmídeos.

Existem programas de controlo de mastites, nomeadamente o “*plano de controlo de 5 pontos*” (Kingwill, 1981) para controlo de agentes patogénicos contagiosos, que consiste na manutenção das salas de ordenha, na desinfecção dos tetos após a ordenha (*post-dip*), no tratamento das mastites clínicas durante a lactação, no refúgio de animais afectados por mastites crónicas e na antibioterapia de secagem. No entanto, verifica-se que nalguns casos a forma como estes programas de controlo são aplicados, não garante a eliminação dos agentes contagiosos das explorações leiteiras (Bexiga *et al.*, 2005).

Adicionalmente, as medidas preventivas utilizadas à alguns anos demonstraram melhor eficácia contra agentes patogénicos de natureza contagiosa do que contra agentes de natureza ambiental; desta forma, tem-se observado uma crescente preocupação em

entender a biologia destes microrganismos e desenvolver estratégias de controlo de agentes patogénicos ambientais associados a mastites bovinas, como *S. uberis* (Douglas *et al.*, 2000; Phuektes *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1999; Zadoks *et al.*, 2003).

Para desenvolver medidas mais eficientes de controlo, é importante conhecer os mecanismos de transmissão e patogenicidade dos agentes causadores das mastites, em particular de *Streptococcus* spp. (Leigh, 1999; Phuektes *et al.*, 2001; Zadoks *et al.*, 2003).

Resistência a antibióticos em agentes patogénicos de mastites

A maior parte dos antimicrobianos utilizados em caso de mastites bovinas, são dirigidos a bactérias Gram-positivas, particularmente *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus aureus*.

Em *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *S. uberis* os agentes β -lactâmicos constituem os antimicrobianos de primeira escolha em profilaxia e tratamento em caso de infecção causada por estes agentes patogénicos, uma vez que a resistência a estes antimicrobianos, tanto quanto sabemos, não tem sido observada (Owens *et al.*, 1997; Schuchat, 2001).

A eritromicina e outros macrólidos são antimicrobianos recomendados como de segunda escolha (a seguir aos antimicrobianos β -lactâmicos) para tratamento desta doença. No entanto, os antimicrobianos macrólidos podem ser a primeira escolha em casos onde se verifica alergia aos antimicrobianos β -lactâmicos. Alguns estudos documentam a emergência e dispersão da resistência em *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *S. uberis* aos macrólidos, particularmente à eritromicina (Betriu *et al.*, 2004; Culebras *et al.*, 2002; de Azavedo *et al.*, 2001; Denamiel *et al.*, 2005; Guérin-Faubleé *et al.*, 2002; Loch *et al.*, 2005; Poyart *et al.*, 2003), em vários Países como o Canadá, França, Argentina e EUA.

Denamiel *et al.* (2005) observaram que, em média, 27,6% de isolados de *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *S. uberis* eram resistentes à eritromicina. Guérin-Faubleé *et al.* (2002) observaram 28% de resistência à eritromicina em *S. uberis* e 16,7% em *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*.

Poyart *et al.* (2003) detectaram os genes *erm*(A), *erm*(B) e *mef*(A) associados à resistência a macrólidos e lincosamidas em isolados *S. agalactiae* de origem humana. Loch *et al.* (2005) detectou o gene *erm*(B) em isolados *Streptococcus* spp. associados a mastites bovinas. (Ver adiante, “Mecanismos de resistência a antimicrobianos relevantes para este estudo”).

Resistência a macrólidos associada a resistência a tetraciclina tem sido observada (Duarte *et al.*, 2005). Estes autores observaram que todas as estirpes *S. agalactiae* de origem humana e origem animal resistentes à eritromicina eram também resistentes à tetraciclina e continham várias associações de genes *erm* e genes *tet*, nomeadamente *erm*(B), responsável pela resistência à eritromicina com *tet*(O), responsável pela resistência à tetraciclina (Duarte *et al.*, 2005). (Ver adiante, “Mecanismos de resistência a antimicrobianos relevantes para este estudo”).

O antimicrobiano tetraciclina não é utilizado para tratamento de infecções causadas por *Streptococcus* spp. em humanos. No entanto, outros estudos de susceptibilidade a este antimicrobiano, em particular em *Streptococcus* spp., têm revelado que elementos genéticos que transferem resistência à tetraciclina, podem também transferir determinantes de resistência a macrólidos, lincosamidas e cloranfenicol (Culebras *et al.*, 2002).

A utilização de tetraciclina em veterinária é frequente em alguns Países (Silva & Inês, 2000) e o seu uso pode conduzir a níveis elevados de resistência, observados em particular em *Streptococcus* spp. e ser um potencial factor de risco de aquisição de outros genes de resistência, como a macrólidos.

Com efeito, elevada resistência à tetraciclina tem sido observada em *Streptococcus* spp. associadas a mastites bovinas em vários países como a França, Brasil e Estados Unidos (Brown & Roberts, 1991; Duarte *et al.*, 2005; Guérin-Faubleé *et al.*, 2002).

As lincosamidas também são utilizadas em terapia de mastites bovinas. No entanto, a emergência de estirpes resistentes à pirlimicina tem sido observada em *S. uberis* (Salmon *et al.*, 1998; Watts *et al.*, 1995). Num estudo sobre *Streptococcus* spp. associados a mastites bovinas foi também encontrada resistência à clindamicina (uma lincosamida), em 25,5% de todos os isolados das três espécies (Denamiel *et al.*, 2005).

Susceptibilidade ao cloranfenicol e vancomicina tem sido observada (Guérin-Faubleé *et al.*, 2002).

Em Portugal, resistência aos β -lactâmicos considerados de primeira escolha para utilização de tratamento de mastites não foi observado (ver Anexo 1: *Comunicações em Congressos*). No entanto, verificaram-se em especial resistências elevadas: à gentamicina (aminoglicosídeo) em *S. agalactiae* (90%) e *S. uberis* (80%); à colistina em *S. agalactiae* (100%), *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (76,5%) e *S. uberis* (100%); à estreptomicina em *S. agalactiae* (97%), *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (77%) e *S. uberis* (100%); e à tetraciclina em particular em *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (100%). Resistência a alguns destes antimicrobianos têm sido também documentada em outros Países (Guérin-Faubleé *et al.*, 2002; Jayarao & Oliver, 1992; Rossitto *et al.*, 2002).

Breve descrição do género *Streptococcus* e das espécies *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *Streptococcus uberis*

As bactérias do género *Streptococcus* são Gram positivas, catalase negativas, anaeróbias facultativas, esféricas ou ovóides com menos de 2 μ m de diâmetro (Murray, 2004). Embora se propaguem na presença de oxigénio, são incapazes de metabolismo respiratório e são exigentes sob o ponto de vista nutritivo, crescendo melhor em meios complexos (enriquecidos com sangue). Fermentam a glicose e outros hidratos de carbono. Produzem leucina aminopeptidase (LAP) e a produção de pirrolidonil arilamidase (PYR) varia com a espécie. Podem ser parasitas ou comensais do homem e animais e alguns comportam-se como patogénios, causando infecções eventualmente mortais em humanos e animais.

A classificação dos organismos do género *Streptococcus* em espécies, constituiu sempre controvérsia (Facklam, 2002) devido ao sistema de classificação normalmente utilizado, ser baseado numa abordagem dicotómica que tem apenas em conta um número limitado de características complexas, como é o caso do tamanho das colónias, hemólise e grupo de hidrato de carbono específico (Facklam, 2002). No entanto, as propriedades hemolíticas e a

presença do hidrato de carbono específico, que permite a classificação serológica de Lancefield em Grupos designados por letras (Lancefield, 1933), são duas características fenotípicas ainda utilizadas actualmente para identificação de espécies pertencentes ao género *Streptococcus* (ver adiante).

Nos últimos 15 anos têm ocorrido alterações quanto à taxonomia e nomenclatura no género *Streptococcus*, pois é cada vez mais frequente a utilização de técnicas baseadas na detecção de sequências genómicas para identificação de microrganismos, utilizadas para delinear diferenças a nível da espécie e género em bactérias (Facklam, 2002). Por exemplo, o género *Diplococcus* que compreendia uma única espécie, o pneumococo (*D. pneumoniae*), foi extinto, porque não havia base genética que justificasse a existência desse género e o pneumococo foi incluído no género *Streptococcus* como *Streptococcus pneumoniae*. Os enterococos, anteriormente considerados *Streptococcus* do Grupo D e os lactococos anteriormente classificados como *Streptococcus* do Grupo N, passaram a pertencer a novos géneros – *Enterococcus* e *Lactococcus*.

Vieira *et al.*, (1998) utilizando a técnica de electroforese enzimática multilocus (MEE) e hibridação determinaram as relações genotípicas entre diferentes categorias fenotípicas de *Streptococcus dysgalactiae*. Ambas as características fenotípicas e genotípicas levaram estes autores a definir dois subgrupos desta espécie: *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*.

No entanto, Facklam (2002) apresenta um esquema de identificação baseado apenas em características fenotípicas, apesar das limitações, uma vez que considera ser mais fácil e rápido para os microbiologistas clínicos, incluir espécies em grupos com características fenotípicas semelhantes, utilizando para isso apenas alguns testes.

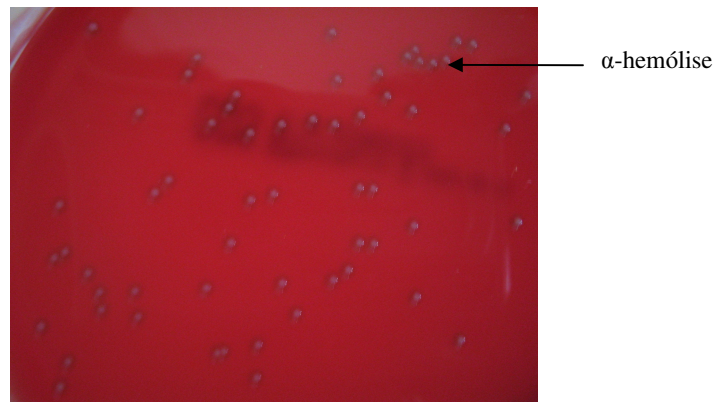
Com efeito, em microbiologia clínica a reacção hemolítica das bactérias pertencentes ao género *Streptococcus* ao meio suplementado com sangue, é uma característica fenotípica muito importante utilizada na identificação de espécies pertencentes a este género. Quando a hemólise é incompleta, ou seja, quando há destruição parcial dos glóbulos vermelhos devido à produção de peróxido de hidrogénio, há libertação de hemoglobina para o meio, conferindo a cor esverdeada ao meio na zona à volta da colónia. A este tipo de hemólise dá-se o nome de α -hemólise (ver Fig. 1.A). Quando a hemólise é completa e há destruição completa dos glóbulos vermelhos, forma-se na zona à volta da colónia uma descoloração completa do meio, que é caracterizada por β -hemólise (ver Fig. 1.B). A ausência de hemólise também é designada por γ -hemólise.

A β -hemólise em isolados de *S. agalactiae* não é muito visível, caracteriza-se por um halo muito pequeno à volta da colónia. Esta característica específica, distingue esta espécie de outras espécies β -hemolíticas como é o caso de *Streptococcus pyogenes*, que se caracteriza por um halo grande de β -hemólise bem visível à volta da colónia. No caso de *S. uberis*, as colónias não apresentam hemólise, sendo esta espécie caracterizada visualmente por colónias pequenas brancas com γ -hemólise.

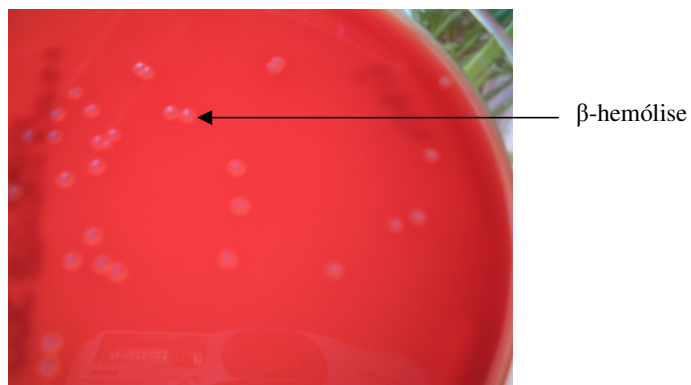
Os grupos de carboidratos antigénicos, ou grupos antigénicos de Lancefield (originalmente descritos por R. Lancefield, em 1933) estão associados a cada uma das espécies (Facklam, 2002).

S. agalactiae é a única espécie deste género que tem o carboidrato antigénico do grupo B, podendo designar-se também, como referido anteriormente, por *Streptococcus* do Grupo B (GBS, de Group B *Streptococcus*). Os isolados de GBS tipicamente hidrolizam o hipurato e dão resposta positiva ao teste CAMP (Christie, Atkins, Munch-Peterson). Podem ainda ser identificados pela reacção hemolítica, β -hemólise, que é única por apresentar uma pequena zona de lise. Os isolados de *S. agalactiae* podem ainda ser classificadas de acordo com a estrutura do seu polissacárido capsular (CPSs de “type-specific capsular polysaccharides”). Até ao momento, foram descritos nove serótipos distintos para *S. agalactiae*: Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII e VIII.

McDonald *et al.* (2005), desenvolveram um método baseado em PCR para identificação de *Streptococcus* spp. associados a mastites bovinas, através da amplificação de sequências de genes específicos de cada espécie. A amplificação de vários genes como o que codifica para o factor CAMP, permite determinar a espécie.



A



B

Figura 1. Imagem de placas com meio agar com 5% de sangue de carneiro semeadas com **A** - *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*; **B** - *Streptococcus agalactiae*.

S. dysgalactiae subsp. *dysgalactiae* pertence ao Grupo C de Lancefield, designando-se também, como referido anteriormente, por *Streptococcus* do Grupo C (GCS, de *Group C Streptococcus*) (Facklam, 2002). A composição exacta do taxon *Streptococcus dysgalactiae*, tem sido alterada nos últimos anos. Vandamme *et al.* (1996), propôs a designação *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* para estirpes de origem animal e o nome *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* para isolados de origem humana. Esta divisão foi confirmada por Vieira *et al.* (1998), que com base em estudos moleculares, como a referida anteriormente, concluíram que as características fenotípicas e genotípicas eram concordantes.

Isolados pertencentes a *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* podem ser dos grupos A, C, G e L de Lancefield e são β -hemolíticos, enquanto que *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* é de origem bovina e α -hemolítico (Facklam, 2002) e não possui actividade da estreptoquinase (não produz fibrinolizina o que não altera o plasminogénio humano). O isolamento desta bactéria em humanos não foi ainda documentada (Facklam, 2002).

S. uberis não pertence a nenhum grupo de Lancefield (Facklam, 2002). Não apresenta nem β nem α -hemólise, dá resposta positiva aos testes leucina aminopeptidase (LAP) e pirrolidonil arilamidase (PYR) e hidroliza o hipurato (Facklam, 2002). Bentley *et al.* (1993), desenvolveram uma técnica para diferenciar *S. uberis* e *S. parauberis* baseada na sequenciação de rRNA 16S, uma vez que é difícil a diferenciação destas duas espécies a partir de testes bioquímicos (Leigh, 1999). No entanto, são muito pouco os casos documentados de isolamento de *S. parauberis* associados a mastites de bovinos (Leigh, 1999) e devido a isso, muito pouco é conhecido sobre a incidência desta espécie em casos de mastite. Não são conhecidos casos de isolamento de *S. uberis* em humanos (Facklam, 2002).

Tipagem e caracterização molecular de isolados de *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *Streptococcus uberis*

As técnicas de tipagem molecular têm como finalidade a caracterização genotípica dos microrganismos, por forma a ser conhecida a sua epidemiologia molecular e devem complementar a caracterização fenotípica.

A epidemiologia molecular assenta na avaliação da relação genotípica dos isolados (clonalidade), fundamental para se identificarem os reservatório e vias de transmissão de agentes patogénicos ou de genes de resistência a antimicrobianos ou de virulência.

Entre os vários métodos de tipagem molecular, a electroforese em gel de agarose em campo pulsado, PFGE (“Pulsed-Field Gel Electrophoresis”) é o método considerado de maior poder de resolução (Tenover *et al.*, 1995).

A estrutura da população bacteriana, pode ser estudada por sequenciação de múltiplos *loci*, MLST (“Multilocus Sequence Typing”). Este esquema está hoje disponível para vários microrganismos e permite comparar a base (ou *background*) genómica a nível global (Maiden *et al.*, 1998).

Descreve-se a seguir em maior pormenor estas metodologias.

- *Electroforese em campo pulsado (Pulsed-field gel electrophoresis - PFGE)*

Este é considerado o método mais discriminatório utilizado na tipagem de uma série de microrganismos patogênicos, incluindo agentes patogênicos associados a mastites bovinas (Baseggio *et al.*, 1997; Douglas *et al.*, 2000; Duarte *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2003; Merl *et al.*, 2003; Phuektes *et al.*, 2001; Poyart *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 1999) e humanos, sendo considerado o mais adequado para o estudo de surtos epidêmicos (Tenover *et al.*, 1995). Esta técnica tem a capacidade de identificar a microvariação existente entre isolados, o que é necessário para se conseguir distinguir estirpes que “circulam” em determinada zona geográfica (Maiden *et al.*, 1998).

Esta técnica quando utilizada para tipagem bacteriana, baseia-se na utilização de enzimas de restrição que reconhecem sequências pouco frequentes do DNA cromossomal, ou enzimas de restrição de corte raro, dando origem a fragmentos de massa molecular elevada - macrofragmentos de DNA que são depois separados por electroforese, utilizando aparelhos próprios de campo pulsado. Os padrões de DNA gerados são depois comparados de modo a se estabelecer qual a relação epidemiológica entre os isolados a que esses padrões correspondem (Tenover *et al.*, 1995). Segundo estes autores, dois isolados que apresentem o mesmo padrão de restrição (com um mínimo de 10 bandas) pertencem à mesma estirpe, enquanto que isolados que apresentem padrões de restrição diferentes, tanto no número de fragmentos, como na posição desses fragmentos pertencem a estirpes diferentes, que devem ser consideradas como relacionadas (se tiverem até três fragmentos diferentes) ou possivelmente relacionadas (se tiverem até seis fragmentos diferentes). Estes autores para além desta proposta de critérios para interpretação dos resultados, sugerem qual a relação entre alterações genéticas que modificam os locais de restrição e as variações observadas nos perfis de restrição gerados por PFGE.

- *Multilocus sequence typing (MLST)*

Quando se caracterizam microrganismos patogênicos utilizando técnicas convencionais e técnicas moleculares de tipagem, por vezes torna-se difícil a comparação dos resultados entre laboratórios. Esta é considerada a mais importante limitação dos métodos de tipagem que se utilizam actualmente (Maiden *et al.*, 1998), particularmente se se pretende estudar a epidemiologia global de determinado microrganismo patogénico. O método de sequenciação de múltiplos *loci* (multilocus sequence typing, MLST), foi desenvolvido recentemente e permite ultrapassar este problema, pois permite estudar a dinâmica de populações a uma escala global (Maiden *et al.*, 1998) (<http://pubmlst.org>).

Trata-se de um método que se baseia na amplificação de fragmentos internos de genes nativos (ou *housekeeping*) por PCR e a sua posterior sequenciação.

Para cada *locus*, cada sequência nucleotídica diferente é considerada como um alelo diferente, ao qual se atribui um número. Cada isolado é definido por um perfil alélico, correspondendo aos alelos dos sete *loci* considerados. Isolados que apresentem o mesmo perfil alélico são considerados como pertencentes à mesma sequência-tipo, ou ST (“Sequence Type”). Quando dois isolados partilham o mesmo ST são considerados como descendentes de um ancestral comum. Identificam-se como sendo assim, porque partilham os mesmos alelos para cada um dos *loci* considerados (Enright *et al.*, 2001). É possível também identificar complexos clonais, que são grupos de isolados com ST que partilham

pelo menos quatro *loci* com o ST do isolado considerado ancestral dos outros membros do complexo clonal (Coffey *et al.*, 2006; Pullinger *et al.*, 2006).

A linhagem genética baseada em ST pode ser determinada pelo programa BURST (“Based Upon Related Sequence Types”) (<http://eburst.mlst.net>), que é um algoritmo que foi desenvolvido para examinar as relações entre os isolados do mesmo grupo ou complexo clonal, com base nos resultados obtidos por MLST. Tem como o objectivo determinar o genótipo mais ancestral de cada complexo clonal, a partir do qual as variantes clonais descenderam (Feil *et al.*, 2004).

Esta metodologia é uma forma de tipagem que utiliza a variação que se acumula muito lentamente na população, sendo muito provável que esta variação seja selectivamente neutra. É por esta razão que a tipagem por MLST, se baseia na identificação de alelos directamente a partir de sequências nucleotídicas de fragmentos de genes *housekeeping*. Métodos com os quais se relaciona a variação evolutiva que ocorre rapidamente (como o PFGE), são úteis para estudos epidemiológicos de curta duração, não sendo os mais adequados para estudos de epidemiologia global (Maiden *et al.*, 1998).

Com esta técnica, tornou-se possível a troca de dados entre laboratórios, permitindo que uma base de dados por espécie, se desenvolva a nível global numa *web site* específica, de modo a que dados relativos a tipagem molecular úteis para estudos epidemiológicos globais, se possam trocar e comparar pela *internet*.

Este esquema foi desenvolvido para diversos microrganismos (ver <http://www.mlst.net/>). Em *Streptococcus* spp. responsáveis por mastite bovina está disponível apenas para *S. agalactiae* (<http://pubmlst.org/sagalactiae/>; Jones *et al.*, 2003) e para *S. uberis* (<http://pubmlst.org/suberis/>; Coffey *et al.*, 2006).

Mecanismos de resistência a antimicrobianos relevantes para este estudo

Na caracterização genotípica dos isolados, em particular dos resistentes aos antimicrobianos, para além da tipagem molecular é importante identificar os genótipos e mecanismos moleculares de resistência aos antimicrobianos. No âmbito desta Tese tivemos particular interesse nos macrólidos e tetraciclina.

Como referido anteriormente, os antimicrobianos macrólidos e lincosamidas e estreptograminas (MLS), são quimioterápicos distintos que inibem a síntese proteica das bactérias Gram positivas. Três mecanismos diferentes de aquisição de resistência do tipo MLS (resistência cruzada a macrólidos, lincosamidas e estreptogramina B) foram encontrados em bactérias Gram positivas (Leclercq & Courvalin, 1991; Weisblum, 1995 (a); Weisblum, 1995 (b); Weisblum, 2000). Um dos primeiros mecanismos de resistência a macrólidos descritos é o que ocorre devido a N-6-N'-6-metilação da adenina na posição 2058 no rRNA 23S, mediada por uma metilase específica. Esta alteração no rRNA 23S (local de ligação comum aos antibióticos MLS), confere resistência cruzada aos antibióticos MLS, designando-se de fenótipo de resistência MLS_B, sendo este o tipo de resistência mais comum (Fluit *et al.*, 2001). Os genes que codificam para as metilases específicas designam-se de genes *erm* (“erythromycin ribosome methylation”) (Roberts *et al.*, 1999). Os genes *erm* foram detectados em *Streptococcus* spp. associados a casos de mastite em bovinos de leite por Roberts & Brown (1994). Estes genes *erm* estão

localizados em transposões ou plasmídeos podendo ser transmitidos horizontalmente (Roberts & Brown, 1994; Salyers *et al.*, 1995).

A expressão do fenótipo de resistência MLS_B pode ser constitutiva ($cMLS_B$) ou indutível ($iMLS_B$). Alguns autores verificaram que este tipo de resistência em *Staphylococcus* spp. depende da sequência da região reguladora a montante do gene estrutural que codifica para a metilase (Lodder *et al.*, 1996; Werckenthin *et al.*, 1999). A resistência MLS_B em *Streptococcus* pode também ser constitutiva ou indutível e os macrólidos podem actuar como indutores a diferentes níveis. No entanto, a metilação ribossomal em *Streptococcus* spp. conduz sempre à resistência cruzada entre os antibióticos MLS, quer seja indutível ou constitutiva (Fluit *et al.*, 2001).

Foram descritos mecanismos de efluxo, que são responsáveis pelo efluxo de antibiótico da célula bacteriana, o que permite à célula manter a sua concentração intracelular e proteger os ribossomas do antibiótico (Arpin *et al.*, 1999; Clancy *et al.*, 1997; Roberts *et al.*, 1999; Sutcliffe *et al.*, 1996). O gene *mef* (“macrolide efflux”) codifica para este tipo de resistência. Isolados de *Streptococcus* spp. com genes *mef* apresentam o fenótipo de resistência M (“macrolide”), que significa, resistência a macrólidos e susceptibilidade a lincosamidas e estreptogramina B (Roberts *et al.*, 1999).

Recentemente, foi também descrito outro fenótipo de resistência a macrólidos em *S. agalactiae* de origem humana (Malbruny *et al.*, 2004). Este fenótipo foi descrito por outros autores em isolados de *S. agalactiae* de origem bovina (Denamiel *et al.*, 2005) e *S. uberis* (Guérin-Faubleé *et al.*, 2002). O fenótipo de resistência LSA (“lincosamide-streptogramin A”), caracteriza-se pela susceptibilidade à eritromicina e resistência às lincosamidas e estreptogramina A (Malbruny *et al.*, 2004).

Os determinantes da resistência à tetraciclina em *Streptococcus* spp. associados a mastites bovinas foram primeiro observados por Brown & Roberts (1991), utilizando a técnica de hibridação DNA-DNA. Os genes de resistência codificam para dois mecanismos conhecidos de resistência à tetraciclina. Um é o mecanismo de efluxo do antibiótico da célula bacteriana e o outro mecanismo confere protecção ao ribossoma (Fluit *et al.*, 2001; Levy *et al.*, 1999; Roberts, 1996). Os genes *tetK* e *tetL* codificam para proteínas de efluxo e os genes *tetM*, *tetO*, *tetQ*, *tetS*, *tetT* e *tetW* codificam para a protecção do ribossoma mediada por proteínas citoplasmáticas (Roberts, 1996). A maioria dos genes *tet* estão associados a elementos genéticos móveis, o que parece justificar a sua grande distribuição por diferentes espécies bacterianas (Chopra & Roberts, 2001; Roberts, 1996; Salyers *et al.*, 1995). Tem sido observado que alguns transposões, como é o caso do Tn1545, podem conter genes que conferem resistência à eritromicina e também o *tetM* (Clewel, *et al.*, 1995).

Factores de virulência em *Streptococcus dysgalactiae*, subsp. *dysgalactiae*, relevantes para este estudo

Para um agente patogénico colonizar a glândula mamária do bovino em fase de lactação, tem de primeiro ter acesso à glândula e depois multiplicar-se rapidamente para não ser eliminado por completo durante as ordenhas, ou então aderir ao tecido do hospedeiro. De forma a induzir a mastite clínica, o agente infeccioso tem que induzir uma resposta inflamatória. Para conseguir persistir na glândula mamária, o microorganismo tem de ter a capacidade de resistir à acção bactericida de células fagocitadas presentes na secreção

(Leigh, 1999). De forma a sobreviver no ambiente do hospedeiro, o agente patogénico deve adquirir nutrientes e evitar o sistema imunitário do hospedeiro.

Vários factores de virulência têm sido identificados em *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, no entanto pouco se sabe sobre a importância relativa destes factores na transmissão e patogenicidade das mastites causadas por este agente patogénico (Calvinho *et al.*, 1998).

S. dysgalactiae subsp. *dysgalactiae* tem a capacidade de interagir com proteínas do hospedeiro como a fibronectina, fibrinogénio, colagénio e vitronectina (Calvinho *et al.*, 1998), mediado por proteínas de superfície produzidas pela bactéria. Foi observado, a partir de estudos *in vitro* que este agente patogénico tem ainda a capacidade de invadir e persistir em células epiteliais da glândula mamária de vacas (Almeida & Oliver, 1995).

S. dysgalactiae subsp. *equisimilis* (*Streptococcus* dos grupos C ou G, GGS) é um agente patogénico de humanos que causa doenças semelhantes às causadas por *S. pyogenes*.

Foi observado que *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* possui um factor de virulência comum ao agente patogénico humano *S. pyogenes*, que consiste em proteínas semelhantes à proteína M (Vasi *et al.*, 2000), uma proteína de superfície de *S. pyogenes* considerada como o mais importante factor de virulência por conferir capacidade de resistir à fagocitose (Fischetti, 1989; Robinson & Kehoe, 1992). Foi também observado que elementos genéticos móveis, como fagos e transposões, estão implicados na transferência lateral de genes entre espécies, em particular entre *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* e *S. pyogenes* e foi observado também que essa transferência pode ocorrer mais frequentemente em regiões demográficas onde se observa elevada endemidade de *S. pyogenes* (Davies *et al.*, 2005). Estas observações são importantes no que diz respeito a entender a epidemiologia de doenças estreptocócicas em determinada região.

Embora se saiba que a aquisição lateral de genes ocorre entre estas duas espécies, desconhece-se os mecanismos e extensão da aquisição lateral de genes entre estas duas espécies (Davies *et al.*, 2005).

A disseminação horizontal de genes codificados por fagos, como os que codificam para superantígenos, que são importantes toxinas que actuam sobre o sistema imunitário humano, promovendo a libertação excessiva de citocinas que pode ser mediada por transdução fágica provocando choque sistémico (Alouf & Müller-Alouf, 2003).

No âmbito deste trabalho procurou testar-se *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* quanto à presença dos genes de virulência fágicos de *S. pyogenes* - as toxinas eritrógenas e superantígenos codificadas pelos *speC*, *speA* e *ssa*. Deste modo procurou investigar-se a extensão de transferência lateral de genes entre *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *S. pyogenes*, uma vez que se sabe que ocorrem entre *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* e *S. pyogenes* e *S. agalactiae* (Davies *et al.*, 2005; Ferretti *et al.*, 2004).

Enquadramento e Objectivos do estudo

Em Portugal, têm vindo a ser desenvolvidos estudos, pelo grupo de investigação coordenados por C. Vilela, PhD, no Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), Faculdade de Medicina Veterinária (FMV/UTL), que visam documentar a prevalência de mastites bovinas, distribuição dos agentes patogénicos responsáveis por esta doença (Bexiga *et al.*, 2005) e determinação do padrão de susceptibilidade dos agentes patogénicos aos antimicrobianos utilizados para terapia de mastites bovinas. Parte dos resultados obtidos foram publicados por Bexiga *et al.* (2005).

No entanto, a epidemiologia molecular de isolados de campo de *Streptococcus* spp. responsáveis por grande parte dos casos de mastites em bovinos de leite ainda não foi documentada em Portugal.

Deste modo, um dos objectivos do presente estudo foi estudar a clonalidade de uma colecção de *Streptococcus* spp. associadas a mastites subclínicas de bovinos leiteiros.

Fazem parte desta colecção 32 isolados de *S. agalactiae* (Group B *Streptococcus*), 17 *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (Group C *Streptococcus*) e 30 *S. uberis*. Os métodos usados foram PFGE para estudar a clonalidade e grau de disseminação de todos os isolados das três espécies e por MLST para avaliar a estrutura genómica da população de *S. uberis* e *S. agalactiae*.

Por outro lado, noutros Países, existem recomendações acerca de qual o antibiótico a ser utilizado em primeira linha para o tratamento de mastites bovinas, mas em Portugal, tais recomendações são ainda inexistentes. Outro objectivo do presente trabalho, foi o de determinar os padrões de resistência dos isolados a vários antimicrobianos, em conjunto com o grupo de investigação da Faculdade de Medicina Veterinária (CIISA, FMV/UTL).

No âmbito deste trabalho foram ainda identificados os determinantes da resistência aos vários antimicrobianos estudados em todas as estirpes identificadas como resistentes. Foi ainda iniciada a pesquisa de factores de virulência para avaliação da transmissão de genes de virulência e fagos inter-espécies.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Meios de cultura, tampões, soluções, enzimas e dNTPs, agaroses, antimicrobianos, padrões de massa molecular de DNA, sistemas comerciais e equipamentos

Meio líquido “Mueller Hinton” desidratado (Difco, Becton Dickinson, France).

Preparado de acordo com as instruções do fabricante. Conservado à temperatura ambiente.

Para preparar 1 L de meio líquido “Mueller Hinton”, adicionaram-se 21 g de meio “Mueller Hinton” desidratado (Difco, Becton Dickinson, France) a água desmineralizada até perfazer 1000 ml. Autoclavou-se a 120 °C durante 20 minutos.

Glicerol 50% (J.T. Baker B.V, Deventer, Holland).

Solução *stock* preparada a 50% (v/v) em água desmineralizada. Autoclavou-se a 110 °C durante 25 minutos. Conservado à temperatura ambiente.

Meio líquido “Mueller Hinton” (Difco, Becton Dickinson, France) **com 15% de Glicerol** (J.T. Baker B.V, Deventer, Holland).

Mistura preparada em condições de asséptica a partir do meio de cultura estéril e da solução de glicerol a 50%. Conservado a 4 °C.

Meio líquido “Todd-Hewitt” desidratado (Oxoid[®], Basingstoke, UK).

Preparado de acordo com as instruções do fabricante. Conservado à temperatura ambiente.

Para preparar 1 L de meio líquido “Todd-Hewitt”, adicionaram-se 36,4 g de meio “Todd-Hewitt” desidratado (Oxoid[®], Basingstoke, UK) a água desmineralizada até perfazer 1000 ml. A mistura foi aquecida e misturada durante alguns minutos para dissolução. O meio foi autoclavado a 120 °C durante 20 minutos.

Meio sólido “Columbia”, suplementado com 5% de sangue de carneiro, estéril, em placa de Petri (bioMérieux[®], Marcy l’Etoile, France).

Meio sólido “Mueller-Hinton”, suplementado com 5% de sangue de carneiro, estéril, em placa de Petri (bioMérieux[®], Marcy l’Etoile, France).

Meio sólido “Mueller-Hinton” (Difco, Becton Dickinson, France)

Preparado de acordo com as instruções do fabricante. Conservado à temperatura ambiente.

Para preparar o meio “Mueller Hinton” sólido, adicionaram-se 21 g de meio “Mueller Hinton” desidratado (Difco, Becton Dickinson, France) a água desmineralizada até perfazer 1000 ml e agar (Difco, Becton Dickinson, France) (17 g/L). O meio foi esterilizado em autoclave a 120 °C, durante 20 minutos.

Tampão PIV (10 mM Tris pH 8; 1 M NaCl) (Chung *et al.* 2000)

Para preparar o tampão PIV, utilizou-se 5 ml de 1 M Tris pH 8, 29,2 g de NaCl (Merk, Darmstadt, Germany), e adicionou-se água bidestilada de modo a perfazer 500 ml. O tampão foi autoclavado a 120 °C durante 20 minutos e conservado a 4 °C.

1M Tris, pH 8

Para preparar 1 L de solução 1 M de Tris a pH 8, pesam-se 121,1 g de Trizma base (121,1 g/mol) (Calbiochem, La Jolla, California, USA) e adicionam-se 800 ml de água bidestilada. Ajusta-se o pH a 8, adicionando 0.1 N de HCl. Por fim, adiciona-se água bidestilada de modo a perfazer 1 L e a solução é autoclavada a 120°C, 20 minutos e conservada à temperatura ambiente (Sambrook J and Russell DW, 2001).

Tampão EC (6 mM Tris pH 8, 1 M NaCl, 100 mM EDTA pH 8, 0,2% desoxicolato de sódio, 0,5% laurilsarcosina de sódio, 0,5% Brij 58) (Chung *et al.*, 2000).

Para preparar 500 ml EC, utilizaram-se 3 ml de 1 M Tris pH 8, 29,2 g de NaCl (Merck, Darmstadt, Germany), 100 ml de 0,5 M EDTA pH 8, 1 g de desoxicolato de sódio (Sigma-Aldrich, EUA), 2,5 g de laurilsarcosina de sódio (Sigma-Aldrich, EUA), 2,5 g de Brij 58

(Sigma-Aldrich, EUA). Adicionar água bidestilada de modo a perfazer os 500 ml e autoclavar a solução a 120 °C durante 20 minutos. Conservar a 4 °C.

0,5 M de EDTA, pH 8

Para preparar 1 L de solução de 0,5 M de EDTA, pH 8, utilizar 186,1 g de EDTA (sal dissódico, 372.2g/mol) (Sigma-Aldrich, EUA). Adicionar 800 ml de água bidestilada autoclavada. Ajustar o pH com NaOH. Adicionar água bidestilada de modo a perfazer 1 L. Autoclavar a 120°C, 20 minutos e conservar à temperatura ambiente (Sambrook J and Russell DW, 2001).

Solução ES (Chung M. *et al.* 2000)

Para preparar 500 ml de solução ES, utilizou-se 5 g de sarcosil (sódio lauroil-sarcosinato, Sigma-Aldrich, EUA), 500 ml de 0,5 M EDTA Na₂ pH 9. Ajustou-se o volume com água bidestilada e autoclavou-se a solução a 120 °C durante 20 minutos. Conservar a 4 °C.

0,5 M EDTA Na₂ pH 9

A solução 0,5 M EDTA Na₂ pH 9 é preparada do mesmo modo que a solução 0,5 M EDTA Na₂ pH 8, sendo a única diferença o ajuste do pH (Sambrook J and Russell DW, 2001).

Solução de Desproteínização ESP (Solução ES e Proteínase K, 1 mg/ml)

A proteínase K em pó (Boehringer, Mannheim, Germany) é misturada ao tampão ES no momento de utilização.

Tampão PBS (“Phosphate Buffered Saline”) (Sambrook J and Russell DW, 2001)

Para fazer 1 L de PBS dissolver 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g NaHPO₄, e 0,24 g de KH₂PO₄ em 800 ml de água bidestilada. Ajustar o pH a 7,4. Adicionar água bidestilada até 1 L. Dispensar esta solução por pequenas quantidades e esterilizar a 120°C, 20 minutos. Armazenado à temperatura ambiente.

Solução 0,9% NaCl (soro fisiológico).

Pesar 0,9 g de NaCl em 100 ml de água bidestilada. Autoclavar a 120 °C durante 20 minutos. Conservar à temperatura ambiente.

Solução 0,85% NaCl

Pesar 1,7 g de NaCl em 200 ml de água bidestilada. Autoclavar a 120 °C durante 20 minutos. Conservar à temperatura ambiente.

Tampão TE 10X (100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8) (Sambrook J and Russell DW, 2001).

Para preparar 1 L de TE 10X (100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8) utilizou-se 10 ml de 1 M Tris, pH 7,5 e 2 ml de 0,5 M EDTA pH 8 e 988 ml de água bidestilada e autoclavou-se a solução a 120 °C durante 20 minutos. Conservar à temperatura ambiente.

Tampão TE 1X (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) (Sambrook J and Russell DW, 2001).

Preparado a partir do tampão TE 10X (diluído em água bidestilada estéril) ou para preparar 100 ml de TE 1X utilizou-se 1 ml de 1 M Tris (pH 7,5), 0,2 ml de 0,5 M EDTA (pH 8) e 98,8 ml de água bidestilada. Autoclavar a 120 °C durante 20 minutos. Conservar à temperatura ambiente.

1 M de Tris, pH 7,5

A solução 1 M de Tris, pH 7,5 é preparada do mesmo modo que a solução 1 M de Tris pH 8, sendo a única diferença o ajuste do pH.

Tampão TBE 0,5X

A 100 ml de TBE 10X (BioRad, California, USA) adicionar 2000 ml de água bidestilada e autoclavar a solução a 120°C, 20 minutos e conservar à temperatura ambiente.

Tampão TAE 1X (Sambrook J and Russell DW, 2001)

Preparado a partir do tampão TAE 50X numa diluição de 1:50 em água bidestilada estéril. Para preparar 1 L de TAE 50X utilizar 242,2 g de Tris base, 57,1 ml de Ácido acético glacial (Merk, KGaA, Darmstadt, Germany), 100 ml de 0,5 M EDTA Na₂ pH 8. Adicionar água bidestilada de modo a perfazer 1 L e autoclavar a 120°C, 20 minutos.

Tampão de extracção de DNA para PCR, 10 mM Tris, pH 8,5

Pesar 0,158 g de Trizma base (Calbiochem, La Jolla, California, USA) e adicionar 100 ml de água bidestilada. Ajustar o pH a 8,5, autoclavar a 120°C, 20 minutos e conservar à temperatura ambiente.

Tampão de reacção para PCR

10X PCR Buffer (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania). Contém 100 mM Tris (pH 8,8 a 25 °C), 500 mM KCl, 0.8% Nonidet P40.

Solução Azul de Bromofenol (Sambrook J and Russell DW, 2001)

0.25% de azul de bromofenol; 40% (w/v) sacarose (Merk, KGaA, Darmstadt, Germany) em água bidestilada estéril.

Solução de Brometo de Etídeo (BioRad, California, USA) (10mg/ml)

A solução *stock* tem a concentração final de 10 mg/ml (BioRad, California, USA),

Lisozima (Sigma-Aldrich, EUA) (1 mg/ml em TE 1X)

A solução *stock* de Lisozima (Sigma-Aldrich, EUA) é preparada a 10 mg/ml em TE 1X (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8), esterilizada por filtração com filtro Milipore 0,45 µm (Orange Scientific, GiroDisc CA, Belgium) e armazenada em alíquotas a -20 °C. As soluções de trabalho, diluídas a 1 mg/ml em TE 1X, são igualmente armazenadas em alíquotas a -20 °C.

Mutanolisina (Sigma-Aldrich, EUA) (5 U/µl em 0,1 M fosfato de potássio)

A Mutanolisina em pó, 10000 U (Sigma-Aldrich, EUA), é ressuspensa em tampão 0,1 M fosfato de potássio, pH 6,2 (Sambrook *et al*, 1989), distribuída em alíquotas e armazenada a -20 °C.

0,1 M fosfato de potássio, pH 6,2

Para preparar 100 ml de 0,1 M fosfato de potássio, pH 6,2, utilizar 8,08 ml de 1 M KH₂PO₄ e 1,92 ml de 1 M K₂HPO₄, e adicionar 90 ml de água bidestilada (Sambrook J and Russell DW 2001).

Hialuronidase, (Sigma-Aldrich, EUA) (1,040 U/mg)

Para preparar hialuronidase a 30 mg/ml utilizar 3 mg de hialuronidase, 89,3 µl de água bidestilada, 7,7 µl de 1 M NaCl, 2 µl de tampão 1 M fosfato de Sódio pH 7, e 1 µl de 10 mg/ml BSA. É preparada no momento de utilização e conservada em gelo até ser utilizada.

1 M fosfato de Sódio pH 7

Para preparar 10 ml de tampão 1 M fosfato de Sódio pH 7 utilizar 5,77 ml de Na₂HPO₄ e 4,23 ml de NaH₂PO₄ (Sambrook J and Russell DW 2001).

RNase (RNase A, tipo I-AS, Sigma-Aldrich, EUA) (50 µg/ml)

A solução é preparada a 10 mg/ml em TE 1X estéril, aquecida a 100 °C durante 15 minutos e arrefecida à temperatura ambiente, distribuída em alíquotas e armazenada a -20 °C (Sambrook J and Russell DW (2001)).

Endonucleases de restrição e respectivos tampões

*Sma*I- 20.000 U/ml (New England BioLabs, Beverly, USA).

*Sfi*I- 20.000 U/ml (New England BioLabs, Beverly, USA).

Tampão pré-*Sma*I

Preparado de acordo com o fabricante.

Para preparar 500 ml de Tampão pré-*Sma*I (6 mM Tris pH 8, 20 mM KCl, 6 mM MgCl₂·6H₂O), utilizar 3 ml de 1 M Tris (pH 8), 0,7456 g de KCl (BDH, Poole, England), 0,61 g de MgCl₂·6H₂O (Merk, KGaA, Darmstadt, Germany). Adicionar água bidestilada de modo a perfazer 500 ml e autoclavar a solução a 120°C, 20 minutos. Conservar à temperatura ambiente. Na altura de usar é adicionado β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, EUA) na proporção de 6.3 µl deste composto para 15 ml de tampão.

Tampão pré-*Sfi*I

50 mM NaCl, 10 mM Tris, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol (pH 7.9 a 25°C). Suplementar com 100 µg/ml BSA. Já incluído com a enzima no sistema comercial. (New England BioLabs, Beverly, USA). Mantido congelado a -20 °C.

Enzima *Taq* DNA Polymerase (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania).

Fornecida a uma concentração de 5 U/µl.

MgCl₂, 25 mM.

Fornecido com a enzima *Taq* DNA Polymerase (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania).

Desoxiribonucleótidos, dNTP MIX, 10 mM (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania).

A mistura contém dATP, dCTP, dGTP e dTTP a uma concentração final de 10 mM.

Iniciadores ou “Primers”

Os primers usados foram fornecidos pela Invitrogen[®], Carlsbad, USA (ver Tabelas 12, 16 e 17).

Agaroses

Agarose SeaPlaque[®] (Cambrex Bio Science Rockland, Inc, USA).

Agarose Seakem[®] LE (Cambrex Bio Science Rockland, Inc, USA).

Agarose Invitrogen Electrophoresis Grade (Gibco BRL[™], Life Technologies, Grand Island, USA).

Antimicrobianos

Discos com antibióticos (Oxoid[®], Basingstoke, England) (ver Tabela 4).

Vancomicina em pó (Vancomycin Hydrochloride, Sigma[®], Missouri, USA). A solução *stock* foi preparada em água bidestilada para uma concentração final de 160 µg/ml.

Escala de McFarland (bioMérieux[®], Marcy l’Etoile, France) para antibiogramas.

Marcador de massa molecular - Lambda ladder PFGE marker, 50 µg/ml (New England BioLabs, Beverly, USA) (ver Fig. 2).

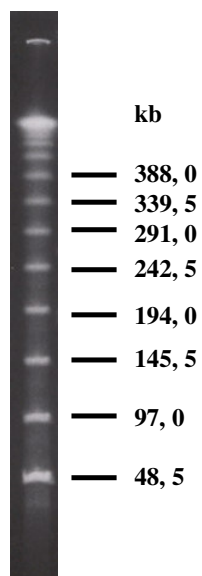


Figura 2. Imagem representativa do marcador de massa molecular utilizado no PFGE (Lambda Ladder PFGE Marker, New England BioLabs, Beverly, USA). Esta imagem foi obtida em 1% agarose Seakem LE, 6 V/cm, a 11,3 °C, durante 23h.

Marcador de massa molecular - O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania) (ver Fig. 3).

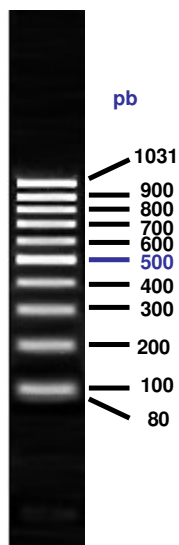


Figura 3. Marcador de massa molecular O'GeneRuler™ 100 bp DNA ladder (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania), utilizado na electroforese em gel de agarose a 1%, para visualização dos amplicões.

Teste de aglutinação (Slidex[®] Strepto Kit, bioMérieux[®], Marcy l'Etoile, France), para identificação de serótipos B e C de Lancefield.

Teste de aglutinação (GBS Serotyping Kit, ESSUM Probiotics, Suécia), para identificação de serótipos em *Streptococcus agalactiae*

Sistema de purificação de DNA, Wizard[®] PCR Preps DNA Purification System (Promega, USA).

Placas MicroWell (Nunclon Surface[®], Fisher Scientific, UK).

Aparelho de electroforese, Horizon[®] 11.14 ou Horizon[®] 58 Gibco BRL Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus (Gibco BRL[™], Life Technologies, Grand Island, USA).

Fonte de alimentação eléctrica, Gibco BRL[™] Model 250EX Electrophoresis Power supply (Gibco BRL[™], Life Technologies, Grand Island, USA).

Aparelho de PFGE, CHEF-DRIII- Chiller System[®]. Pulsed Field Electrophoresis Systems, BioRad, California, USA.

Transiluminador, com sistema fotográfico incorporado – GelDoc Software (BioRad, California, USA) e captação e tratamento de imagem com o programa “Quantity One” (software Quantity One, Version 4.5.0).

Termociclador, Modelo T-Gradient ou UnoII, (Biometra[®], Goettingen, Germany).

Estufas, Laboratory Incubators, Heraeus Instruments, Hanau, Germany.

Microcentrifuga, Biofuge Pico, Heraeus Instruments, Hanau, Germany.

Balança de precisão electrónica, Kern[®], Albstadt, Germany.

Banho seco, Unitek, Dry Block Heat Bath, USA/Scientific Plastics, Milton Keynes, Great Britain.

Plataforma de agitação (Standard Rocking Platform WT 15, Biometra, Gottingen, Germany).

Jarra de anaerobiose e envelope gerador de gás no interior da jarra para manter a atmosfera adequada aos microrganismos anaeróbios estritos (BBL[™] GasPack[™] Plus, Becton Dickinson, France).

2. Origem dos isolados de *Streptococcus* spp.

Para a realização deste estudo foram utilizados no total 79 isolados de *Streptococcus*: *Streptococcus agalactiae* (n=32), *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (n=17) e *Streptococcus uberis* (n=30), cedidos por C. L. Vilela (Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, CIISA – FMV/UTL, Portugal).

Todos os isolados causaram mastite subclínica em bovinos de explorações leiteiras da região Ribatejo-Oeste, Portugal e foram definidos como estirpes de campo (Tabela 1).

A colheita e identificação destes isolados foram documentadas em Bexiga *et al.* (2005). A presença de mastite subclínica em bovinos das explorações mencionadas, foi pesquisada pelo Teste Californiano de Mastites (TCM), entre Janeiro de 2002 e Maio de 2003. Foi realizada a recolha asséptica de amostras de leite, dos quartos das vacas que apresentaram resultado positivo (+++) a este teste (TCM). As amostras foram semeadas em meios de cultura e os microrganismos presentes nas amostras identificados utilizando os sistemas API-20 STREP (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) e o BBL Crystal Gram-Positive (Becton, Dickinson and Company) (Bexiga *et al.*, 2005).

Tabela 1. Origem dos isolados de campo de *Streptococcus* spp. provenientes de mastites subclínicas bovinas incluídos neste estudo, cedidos por C. L. Vilela (CIISA-FMV, Portugal).

Espécie	Nº de isolados	Período de isolamento (mês/ano)	Código da exploração de origem (Região Ribatejo-Oeste)
<i>S. agalactiae</i>	32	01-2002 a 05-2003	A, C, G, I, J, L
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	17	02-2002 a 03-2003	B, C, D, E, F, G, I, J
<i>S. uberis</i>	30	02-2002 a 03-2003	C, D, E, F, I, J, K

Localização geográfica das explorações: exploração A – Bombarral; B – Leiria; C – Azeitão; D – Santarém; E – Campelos; F – Pernes; G – Mafra; I – Torres Vedras; J – Lourinhã; K – Coruche; L – Pegões.

3. Estirpes bacterianas utilizadas como controlo

As estirpes bacterianas utilizadas como controlo em testes de susceptibilidade a antimicrobianos, na detecção de genes de resistência a antibióticos e factores de virulência por PCR, estão indicadas nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2. Estirpes bacterianas utilizadas como controlo em testes de susceptibilidade a antimicrobianos.

Código da estirpe	Ensaio	Cedido por
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619	Antibiograma	H. de Lencastre (ITQB/UNL, Portugal; The Rockefeller University, USA)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	Antibiograma	C. L. Vilela (CIISA-FMV, Portugal)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 29213	MIC's	C. L. Vilela (CIISA-FMV, Portugal)
MIC, concentração mínima inibitória (“minimal inhibitory concentration”).		

Tabela 3. Estirpes bacterianas utilizadas como controlo para detecção de genes de resistência a antibióticos e factores de virulência por PCR.

Código da estirpe	Genótipo	Cedido por
<i>Streptococcus pyogenes</i> 1A77	<i>mef(A)</i> ⁺	GM Rossolini/S. Cresti (Siena University, Italia)
<i>S. pyogenes</i> A200	<i>erm(A)</i> ⁺	GM Rossolini/S. Cresti (Siena University, Italia)
<i>S. pyogenes</i> 18C22	<i>erm(B)</i> ⁺	GM Rossolini/S. Cresti (Siena University, Italia)
<i>S. pneumoniae</i> 8249	<i>tet(M)</i> ⁺	H. de Lencastre (ITQB/UNL, Portugal; The Rockefeller University, USA)
<i>S. pyogenes</i> m46	<i>tet(O)</i> ⁺	P. E. Varaldo (University of Ancona Medical School, Ancona, Italia)
<i>Escherichia coli</i> pGEM-tet(O)	<i>tet(O)</i> ⁺	A. Villedieu (University College, Londres, UK)
<i>S. pyogenes</i> GAS 80	<i>tet(S)</i> ⁺	A. Hammerum (Statens Serum Institut, Copenhagen, Dinamarca)
<i>S. pyogenes</i> GAS 83	<i>tet(S)</i> ⁺	A. Hammerum (Statens Serum Institut, Copenhagen, Dinamarca)
<i>S. pyogenes</i> GAS 97	<i>tet(S)</i> ⁺	A. Hammerum (Statens Serum Institut, Copenhagen, Dinamarca)
<i>E. coli</i> pGEM-tet(W)	<i>tet(W)</i> ⁺	A. Villedieu (University College, Londres, UK)
<i>S. pyogenes</i> A498	<i>tet(T)</i> ⁺	A. Villedieu (University College, Londres, UK)
<i>Enterococcus faecalis</i> DC12	<i>tet(L)</i> ⁺	C. Rodríguez-Avial (Universidad Complutense de Madrid, Espanha)
<i>E. coli</i> pBT-1	<i>tet(Q)</i> ⁺	A. Villedieu (University College, Londres, UK)
<i>S. agalactiae</i> C864 PE	<i>tet(K)</i> ⁺	Neste estudo (C. L. Vilela, CIISA-FMV, Portugal)
<i>S. pyogenes</i> 8563	<i>speC</i> ⁺	M. Kotb (Veterans Affairs Medical Center, Research Service, EUA)
<i>S. pyogenes</i> 8611	<i>ssa</i> ⁺	M. Kotb (Veterans Affairs Medical Center, Research Service, EUA)
<i>S. pyogenes</i> S69	<i>speA</i> ⁺	B. Henriques Normark (Swedish Institute for Infectious Disease Control, Suécia)
<i>S. pyogenes</i> S13	<i>speA</i> ⁺	B. Henriques Normark (Swedish Institute for Infectious Disease Control, Suécia)
<i>S. pyogenes</i> 5448	<i>speA</i> ⁺	M. Kotb (Veterans Affairs Medical Center, Research Service, EUA)

4. Conservação dos isolados

Todos os isolados foram conservados a -80 °C em tubos de criopreservação contendo 1 ml de meio líquido Mueller Hinton suplementado com 15% de glicerol (ver Materiais, ponto 1).

5. Identificação de serogrupos de Lancefield (Slidex® Strepto Kit, bioMérieux®, Marcy l'Etoile, France)

Todos os isolados foram identificados no CIISA – FMV/UTL, Portugal, como já foi referido. A determinação de serogrupos foi realizada, no âmbito deste trabalho, para uma caracterização adicional dos isolados β -hemolíticos e para confirmação das espécies. Foi usado o teste de aglutinação Slidex® Strepto Kit, bioMérieux®. Este sistema comercial é baseado na aglutinação dos antígenos com um anticorpo específico embebido em partículas de látex. Este sistema inclui anticorpos específicos para os grupos de antígenos A, B, C, D, F e G.

O carboidrato do grupo B é um antígeno comum a todas as estirpes de *Streptococcus agalactiae* ou *Streptococcus* do Grupo B (GBS de “Group B *Streptococcus*”). O carboidrato antígeno do grupo B está posicionado próximo da parede celular e é constituído por ramnose, galactose, N-acetilglucosamina e glucitol (Paoletti *et al.*, 2000). O carboidrato do grupo C é um antígeno comum às estirpes de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* ou *Streptococcus* do Grupo C (GCS de “Group C *Streptococcus*”) (Malke, 2000) e é constituído por resíduos de N-acetilgalactosamina nas cadeias laterais de oligossacáridos do carboidrato situado na parede celular.

O teste de aglutinação Slidex® Strepto Kit, bioMérieux® inclui uma enzima de extracção, soro de aglutinação, um teste positivo e cartões próprios de cor preta com várias divisões utilizados para realizar os ensaios. O método foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Colónias isoladas de GBS ou de GCS semeadas no dia anterior em meio “Columbia” com 5% de sangue de carneiro (bioMérieux®, Marcy l'Etoile, France), foram ressuspensas em 150 μ l da solução de enzima de extracção. A suspensão foi depois incubada a 37 °C durante 10 minutos (para a extracção enzimática do antígeno específico da parede celular). Após o período de incubação, foi colocada 15 μ l da suspensão celular do respectivo isolado juntamente com uma gota de cada soro de aglutinação e misturadas em cada divisão do cartão preto. No caso de resultado positivo foi observado o aspecto granuloso das amostras após agitação do cartão durante alguns segundos (aglutinação antígeno-anticorpo específico). No caso de resultado negativo as amostras apresentaram um aspecto leitoso não granulado. Para controlo negativo utilizou-se uma gota do soro de aglutinação e uma gota de solução de enzima de extracção (estéril), que foram agitadas durante alguns segundos.

Os isolados *S. uberis* não pertencem a nenhum grupo de antígenos específico (Facklam, 2002) e, portanto, não aglutinam com nenhum grupo de antígenos incluídos no sistema Slidex® Strepto Kit, bioMérieux®. Para identificação desta espécie outros testes devem ser realizados, nomeadamente o teste PYR (pirrolidonil arilamidase) e sistemas de identificação bioquímica, como API-20 STREP (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Neste estudo, a confirmação da identificação de isolados de *S. uberis* foi baseada na

observação das colónias, na ausência de hemólise e por não aglutinar com nenhum dos serogrupos de Lancefield.

6. Teste CAMP (Christie, Atkins e Munch-Petersen)

O teste CAMP, descrito originalmente por Christie, Atkins e Munch-Petersen, em 1944 (Murray, 2004) é utilizado para identificação presumível de *Streptococcus* do Grupo B (GBS). Os isolados de *S. agalactiae* secretam uma proteína designada por factor “CAMP”, que interage com a β -hemolisina produzida e secretada por *Staphylococcus aureus*, resultando num aumento da hemólise em meio sólido agar-sangue. Esta sinergia de hemólise surge sob a forma de uma seta na placa de Petri, na área onde *S. agalactiae* e *S. aureus* foram semeados próximos (mas sem se tocarem) (ver Fig. 4).

Os isolados de *S. agalactiae* e *S. aureus* (ATCC® 25923) foram repicados em meio “Columbia” suplementado com 5% de sangue de carneiro (bioMérieux®, Marcy l’Etoile, France) e incubados em aerobiose durante 18 a 24 horas.

Este teste é muito sensível e dá resultado positivo mesmo em caso de estirpes de *S. agalactiae* não hemolíticas.

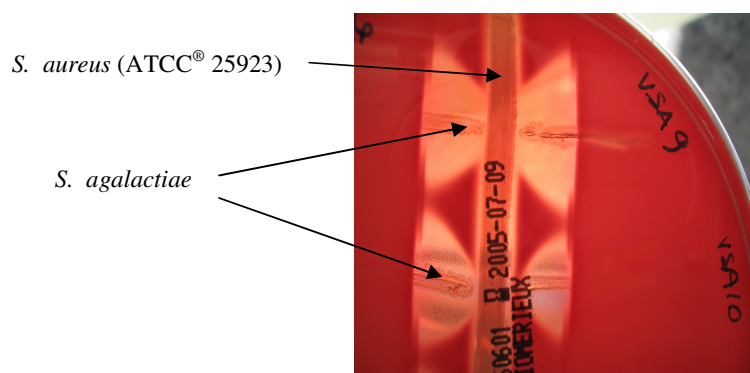


Figura 4. Teste CAMP para identificação presumível de *Streptococcus agalactiae*.

Os isolados de *S. agalactiae* (*Streptococcus* do Grupo B, GBS) foram repicados em ângulo recto em relação à estirpe *S. aureus* ATCC® 25923 em placas agar-sangue, sem que as duas zonas de crescimento se toquem. Após incubação, tornou-se visível um aumento de hemólise (em forma de seta), devido à sinergia de hemólise na zona de intersecção onde ocorreu difusão do factor CAMP e da β -hemolisina no meio. Na figura estão representadas quatro reacções CAMP⁺.

7. Teste de aglutinação para identificação de serótipos em *Streptococcus agalactiae* (GBS Serotyping Kit, ESSUM Probiotics, Suécia)

As estirpes de *S. agalactiae* podem ser classificadas de acordo com a estrutura do polissacárido capsular (type-specific capsular polysaccharides – CPSs). Até agora, foram descritos nove serótipos distintos para *S. agalactiae*: Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII e VIII.

O teste GBS Serotyping Kit, ESSUM Probiotics é baseado no princípio da co-aglutinação. São utilizados anticorpos específicos para cada tipo de antígeno polissacárido de *S. agalactiae*.

Este sistema comercial inclui nove frascos com 1,5 ml de suspensão de células de GGS revestidas com anticorpos de coelho específicos para os antígenos polissacarídeos de *S. agalactiae* (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII e VIII).

Colónias isoladas de *S. agalactiae* semeadas no dia anterior, em meio “Columbia” com 5% de sangue de carneiro (bioMérieux[®], Marcy l’Etoile, France), são adicionadas em separado às diferentes suspensões de anticorpos. No caso de resultado positivo, ocorre aglutinação entre suspensão e o anticorpo correspondente (Hakansson *et al.*, 1992).

8. Electroforese em Gel de Agarose por Campo Pulsado (“Pulsed Field Gel Electrophoresis”, PFGE)

A relação genotípica ou clonalidade de todos os isolados das três espécies foi avaliada por electroforese em gel de agarose em campo pulsado, PFGE (“Pulsed-Field Gel Electrophoresis”), considerado como o de maior poder de resolução (Tenover *et al.*, 1995).

A electroforese em campo pulsado (PFGE) foi desenvolvida para separação de cromossomas ou macrofragmentos de DNA de elevada massa molecular (Schwartz & Cantor, 1984) não resolvidos por electroforese convencional. Para a obtenção de macrofragmentos são utilizadas enzimas de restrição que reconhecem sequências pouco frequentes do DNA cromossomal (enzimas de restrição de corte raro), dando origem a fragmentos de massa molecular elevada. Estes macrofragmentos de DNA são depois separados em electroforese, utilizando aparelhos específicos. Neste estudo foi usado o sistema CHEF-DRIII- Chiller System[®], BioRad, California, USA), no qual os eléctrodos estão dispostos na hexagonal, sujeitando os macrofragmentos de DNA a campos eléctricos que são aplicados alternadamente em duas direcções, de forma a obrigar as moléculas a mudar continuamente a sua direcção de migração (Carle *et al.*, 1986; Chu *et al.*, 1986). Quanto maior for a molécula de DNA maior o tempo necessário para a sua reorientação. Esta técnica quando aplicada em bactérias, obtem-se com a separação de macrofragmentos de restrição de DNA, um padrão de bandas característico para cada estirpe. Esta técnica é útil em estudos de epidemiologia molecular bacteriana, em particular na investigação de surtos de infecção (Tenover *et al.*, 1995).

Neste estudo foram utilizadas duas enzimas de restrição de corte raro: *Sma*I que reconhece a sequência 5’-CCC/GGG-3’; e *Sfi*I que reconhece a sequência 5’-GGCCNNNN/NGGCC-3’ (New England BioLabs, Beverly, USA). O método utilizado para realizar esta técnica foi adaptado de Chung *et al.* (2000).

8.1 Propagação das culturas

Todos os isolados de *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *S. uberis*, foram propagados em meio “Columbia” com 5% de sangue de carneiro (bioMérieux[®], Marcy l’Etoile, France) em aerobiose durante 18 a 24 horas, para isolamento de colónias. Após a incubação, uma colónia foi inoculada em 6 ml de meio líquido “Todd-Hewitt” (ver como preparar o meio no ponto 1), em tubos de 15 ml e incubada a 37 °C, durante 18 a 24 horas. Utilizaram-se 6 ml de meio líquido “Todd-Hewitt” (Oxoid[®], Basingstoke, UK) sem células, para controlo da esterilidade do meio.

8.2. Lavagem celular e ajuste da concentração celular

Após a propagação celular em meio líquido, as culturas de cada isolado foram distribuídas por tubos eppendorf de 2 ml e centrifugadas em microcentrifuga (Biofuge Pico, Heraeus Instruments, Hanau, Germany), durante 20 minutos a 13000 rpm. Os tubos com as células foram sempre mantidos em gelo após a primeira centrifugação. Retirou-se o sobrenadante, tendo cuidado para não descolar o sedimento do fundo do tubo, ao qual se juntou 1 ml de solução PIV (10 mM Tris pH 8; 1 M NaCl) (ver Materiais, ponto 1), que foi utilizado para resuspender todos os sedimentos. As suspensões foram depois centrifugadas durante 25 minutos a 13000 rpm e o sobrenadante retirado. Foram adicionados 200 µl de PIV (10 mM Tris pH 8; 1 M NaCl) para ressuspender as células e foi feito o ajuste da concentração das suspensões celulares de cada isolado. Para tal, foi utilizada uma cuvette com 1 ml de PIV (10 mM Tris pH 8; 1 M NaCl), por isolado, à qual se adicionou 5 µl de suspensão celular para leitura da absorvância num espectrofotómetro a um comprimento de onda de 620 nm. Os valores de absorvância aceitáveis deveriam variar entre 0,025 e 0,15. Após a leitura da absorvância, adicionou-se o volume de PIV (10 mM Tris pH 8; 1 M NaCl) necessário para a densidade óptica final da suspensão celular corresponder a 5,0. O volume de PIV (10 mM Tris pH 8; 1 M NaCl) a adicionar foi obtido pela fórmula:

$$V_{add} (\mu l) = (DO \times 40 \times 210) - 210$$

V_{add} – volume (µl) de PIV a adicionar à suspensão celular

DO – densidade óptica a 620 nm

O volume de PIV a adicionar é aferido tendo em consideração que o volume de suspensão celular no tubo é de aproximadamente 210 µl e tendo em atenção que o valor de absorvância registado corresponde a uma diluição de 5 µl de suspensão em 1 ml de PIV. A equação referida indica que o volume da suspensão celular é de cerca de 210 µl (200 µl de PIV mais a contribuição do sedimento para o volume final) e tem em consideração que o valor de absorvância registado corresponde a uma diluição de 1:200 (5 µl de suspensão em 1ml de PIV).

8.3. Preparação de discos de agarose

Para preparação de discos de agarose com as células foi utilizada a agarose SeaPlaque® (Cambrex Bio Science Rockland, Inc, USA) a 1,5% preparada em tampão PIV (10 mM Tris pH 8; 1 M NaCl) (ver Materiais, ponto 1), sendo necessário 150 µl de agarose por isolado. Foram pipetados 150 µl de cada suspensão celular para um novo microtubo, mantido a 42 °C no banho seco (Unitek, Dry Block Heat Bath, USA/ Scientific Plastics, Milton Keynes, Great Britain). Após 10 minutos, foram pipetados 150 µl da solução de agarose preparada a 1,5%, para a suspensão celular mantida no banho seco. Esta suspensão foi misturada utilizando a ponta da pipeta e o vórtex. Logo de seguida, foram retiradas alíquotas de 20 µl desta suspensão para uma placa de vidro (forrada utilizando *parafilm* e pré-lavada com etanol a 70%), de forma a fazer gotas. Por cada isolado, foram pipetadas 12 gotas que foram depois cobertas com uma lâmina de vidro, de modo a que as gotas ficassem achatadas em forma de disco, com cerca de 1-2 mm de espessura. Os discos foram arrefecidos a -20 °C durante 5 minutos. Após a solidificação, ficaram assim

preparados os discos de agarose com as células de cada isolado, intactas e imobilizadas na matriz da agarose.

8.4. Lise celular

Foi utilizado 1 ml de solução de lise [tampão EC (6 mM Tris pH 8, 1 M NaCl, 100 mM EDTA pH 8, 0,2% Na desoxicolato, 0,5% Na laurilsarcosina, 0,5% Brij 58) com lisozima (Sigma-Aldrich, EUA) a 1 mg/ml em TE 1X (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8), mutanolisina (Sigma-Aldrich, EUA) a 5U/μl em 0,1 M fosfato de potássio, e RNase (RNase A, tipo I-AS, Sigma-Aldrich, EUA) a 50 μg/ml em água] (ver Materiais, ponto 1), em tubo de 15 ml para cada isolado. Os discos foram colocados na solução de lise e incubados a 37 °C durante 5 horas.

8.5. Desproteínização

Retirou-se a solução de lise com uma pipeta com cuidado para não perfurar os discos e preparou-se a solução de desproteínização, no momento de ser utilizada. A proteínase K (Boehringer, Mannheim, Germany), foi preparada a 1 mg/ml em tampão ES (ver Materiais, ponto 1) nos tubos com os discos, 1 ml por cada isolado. Os discos foram depois incubados a 50 °C durante 18 horas.

8.6. Lavagem dos discos de agarose

Foi removida a solução de desproteínização dos tubos e os discos foram lavados com 12 ml de tampão TE 1X (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8) (ver Materiais, ponto 1), para retirar a solução de desproteínização da agarose dos discos assim como dos “restos” celulares, durante 30 minutos, em agitação constante numa plataforma de agitação (Standard Rocking Platform WT 15, Biometra, Gottingen, Germany). Este procedimento de lavagem dos discos durante 30 minutos foi repetido oito vezes e os tubos contendo os discos com o DNA no último tampão TE 1X de lavagem foram armazenados a 4 °C. A conservação a 4 °C permite a viabilidade dos discos durante alguns meses.

8.7. Restrição do DNA em discos de agarose com as endonucleases *SmaI* e *SfiI*

Para a restrição com a endonuclease *SmaI* foi utilizado um microtubo com 150 μl de uma solução de tampão pré-*SmaI* (6 mM Tris pH 8, 20 mM KCl, 6 mM MgCl₂·6H₂O) (ver materiais, ponto 1) e para a restrição com a endonuclease *SfiI*, utilizou-se uma solução de tampão pré-*SfiI* (50 mM NaCl, 10 mM Tris, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, pH 7.9) (ver ponto 1). Foi colocado em cada tubo com a solução de tampão específica para cada enzima, um disco de DNA de cada isolado, durante 40 minutos à temperatura ambiente, de forma a garantir que a solução tenha acção sobre o DNA contido nos discos de agarose. Este tampão foi depois retirado e substituído por 50 μl do mesmo tampão com 20 U (1 μl) da enzima, para cada isolado (ver Materiais, ponto 1). Para a restrição com a enzima *SmaI* os tubos foram incubados a 25 °C. Para a restrição com a enzima *SfiI*, os tubos foram incubados a 50 °C. Em ambos os casos os discos foram incubados durante 18 a 24 horas.

8.8. Paragem da restrição do DNA

Após remoção completa da solução de restrição, foi colocado 5 µl de azul de bromofenol (Merk, KGaA, Darmstadt, Germany) (ver Materiais ponto 1) sobre cada disco. Os discos foram deixados a 4 °C durante a preparação do gel.

8.9. Preparação do gel de agarose para PFGE e aplicação dos discos de DNA nos poços do gel

Para a preparação do gel foi utilizado a agarose Seakem[®] LE (Cambrex Bio Science Rockland, Inc, USA) a 1% em TBE 0,5X (BioRad, California, USA) (ver Materiais, ponto 1). Depois de cozida em micro-ondas e arrefecida até 50 °C, a solução de agarose foi vertida para o suporte do gel, tendo o cuidado de conservar cerca de 2 ml a 50 °C para posteriormente fechar os poços do gel, após a aplicação dos discos. Enquanto o gel solidificava, o aparelho de PFGE (CHEF-DRIII, Chiller System, BioRad, California, USA) foi lavado, durante 3 minutos, com 2 L de água bidestilada autoclavada, sendo este processo repetido três vezes. A última água de lavagem foi substituída por 2 L de tampão TBE 0,5X (BioRad, California, USA) (ver Materiais, ponto 1), que ficou a circular no aparelho até atingir a temperatura de 11,3 °C. Após solidificação do gel, os discos foram retirados do frigorífico e mantidos em gelo enquanto aplicados nos poços do gel, com o auxílio de uma lamela e de uma ansa de 10 µl, garantindo que os discos ficassem aderentes à parede frontal do poço. Nos dois poços que correspondem aos dois extremos do gel, foi colocado um disco de marcador DNA lambda de massas moleculares conhecidas (Lambda Ladder PFGE Marker, 50 µg/ml, New England BioLabs, Beverly, USA) (ver Fig. 2, Materiais, ponto 1). Por fim, foi utilizada a agarose guardada a 50 °C para selar os poços. O gel foi colocado no aparelho de PFGE (CHEF-DRIII, Chiller System, Bio-Rad) e o programa de electroforese iniciado. As condições de corrida do gel foram as seguintes: Tempo inicial de pulso, 5 segundos; Tempo final, 35 segundos; Tempo de corrida, 23 horas; Voltagem, 200 V (6 V/cm).

8.10. Coloração do gel e fotografia da imagem do gel

O gel foi retirado do aparelho e corado durante 40 minutos em 300 ml de água desmineralizada com 25 µl de solução de brometo de etídio a 10 mg/ml (BioRad, California, USA) (ver Materiais, ponto 1).

Por fim, o gel foi colocado no transiluminador (BioRad, California, USA) e a imagem do gel captada utilizando o programa “Quantity One” (Software Quantity One[®]).

9. Elaboração de dendrogramas

Os padrões de restrição gerados por PFGE foram analisados visualmente, de acordo com Tenover *et al.* (1995).

Foi atribuído um número a cada padrão de restrição diferente. Assim, dois padrões de restrição que tenham variação de pelo menos uma banda entre eles, foi-lhes atribuído números diferentes.

Estes padrões foram também comparados através da construção de dendrogramas utilizando o software BioNumerics (Software BioNumerics[®], Versão 4.0, Applied Maths),

no Instituto de Ciência Aplicada e Tecnologia/ Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (ICAT/FCUL). O coeficiente de semelhança utilizado foi o “Dice” e o método de agrupamento foi o “UPGMA” (“Unweighted pair group method with arithmetic average”).

Foram elaborados vários dendrogramas com os perfis de restrição de PFGE obtidos com a enzima *SmaI* (ver Resultados):

- Três dendrogramas, globais, com todos os perfis de DNAs dos isolados de cada uma das três espécies.
- Três dendrogramas apenas com os perfis diferentes de DNAs de isolados de cada uma das três espécies.
- Um dendrograma, conjunto ou representativo, com os perfis diferentes de DNAs de isolados das três espécies.
- Um dendrograma comparativo entre perfis representativos de isolados de *S. agalactiae* deste estudo, de origem bovina, e perfis de DNAs de isolados de *S. agalactiae* de origem humana (provenientes de locais colonização de grávidas e isoladas em laboratórios clínicos de hospitais portugueses). Estes perfis foram obtidos por F. Nogueira (F. Nogueira *et al.*, resultados não publicados) em resultado de um trabalho de colaboração entre a FCT/UNL e o IHMT/UNL)

Todos os isolados com o mesmo padrão de PFGE foram considerados idênticos ou a mesma estirpe. Os isolados com perfis de restrição com menos de 80% de semelhança foram considerados como possivelmente não relacionados genotipicamente. Os isolados com perfis de restrição com 80% de semelhança e superior foram, em geral, considerados como possivelmente relacionados genotipicamente (Ver Resultados).

10. Determinação de perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos por difusão em disco (Antibiogramas) e determinação de concentrações mínimas inibitórias (“Minimum Inhibitory Concentration”, MIC) pelo método de microdiluição.

Todos os isolados foram parcialmente caracterizados no CIISA – FMV/UTL, Portugal, no que diz respeito à susceptibilidade a antimicrobianos de interesse em clínica veterinária, por difusão em disco e microdiluição, nomeadamente: penicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina, gentamicina, estreptomicina, cefazolina, colistina, cefquinoma, rifaximina e sulfametoxazol/trimetoprim.

O objectivo desta parte do estudo foi o de avaliar os padrões de resistência a antimicrobianos em Portugal, de forma a definir uma terapia antimicrobiana mais adequada a ser aplicada, uma vez que padrões de resistência não devem ser extrapolados de outros estudos, porque podem variar entre Países e explorações (Vintov, 2003). (ver Anexo 1: *Comunicações em Congressos*).

No âmbito deste trabalho foram testados, pelo método de difusão em disco, os antimicrobianos descritos na Tabela 4. Foi também utilizado, neste estudo, o antimicrobiano vancomicina em pó (Vancomycin Hydrochloride, Sigma[®], Missouri, USA), para determinar a concentração mínima inibitória (MIC), pelo método de microdiluições. Ambos os métodos foram realizados de acordo com as normas NCCLS (“National Committee for Clinical Laboratory Standards”) para *Streptococcus* spp. de origem veterinária (NCCLS, 2002).

Tabela 4. Antimicrobianos testados pelo método de difusão em disco. De acordo com as Normas “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS, 2002).

Classe de antibióticos	Antibióticos	Abreviatura (como escrito nos discos*)	Carga do disco (µg)
Lincosamidas	Pirlimicina	PIR	2
Macrólidos	Eritromicina	E	15
Cloranfenicol	Cloranfenicol	C	30
Tetraciclina	Tetraciclina	TE	30
Glicopeptídeos	Vancomicina	VA	30

Todos os discos de antimicrobianos são da marca Oxoid®, Basingstoke, England (ver Materiais, ponto 1)

Os fenótipos de resistência aos macrólidos foram determinados pelo teste do duplo disco (Seppälä H. *et al.* 1993), com os discos de eritromicina (E) e pirlimicina (PIR) (NCCLS, 2002).

Os antibióticos testados no âmbito deste estudo foram: eritromicina (da classe dos macrólidos), pirlimicina (lincosamida), tetraciclina, cloranfenicol e vancomicina (glicopeptídeo) (Tabela 4).

Os macrólidos, as lincosamidas, a tetraciclina e o cloranfenicol são antibióticos inibidores da síntese proteica. Estes antibióticos actuam nos ribossomas 70S bacterianos, tendo como alvos as subunidades 30S ou 50S. De um modo geral, não afectam a síntese proteica em eucariontes:

Os **macrólidos** (eritromicina) são produzidos por *Streptomyces* spp. e *Micromonospora* spp. e são activos contra bactérias Gram positivas e algumas bactérias Gram negativas. São utilizados na terapêutica os macrólidos de 14 átomos no anel lactónico (eritromicina), de 15 átomos (azitromicina) e de 16 átomos (miocamicina). O seu mecanismo de acção baseia-se na inibição da síntese proteica ao nível da subunidade 50S dos ribossomas e bloqueiam o local P, prejudicando a transpeptidação e/ou a translocação. A resistência pode ser conferida por diversos mecanismos (ver a seguir), entre os quais, pela alteração enzimática dos ribossomas, mediada por metilases. Esta forma de resistência é induzida pelos macrólidos de 14 membros (eritromicina) e 15 membros (azitromicina), mas não pelos macrólidos de 16 elementos (miocamicina).

As **lincosamidas** (pirlimicina) são produzidas por *Streptomyces lincolnensis* e são activas contra bactérias Gram positivas aeróbias-anaeróbias facultativas, sendo principalmente activas contra bactérias anaeróbias estritas. O seu mecanismo de acção baseia-se na inibição da síntese proteica ao nível da subunidade 50S dos ribossomas de procariontes, impedindo a síntese proteica. O mecanismo é idêntico ao dos macrólidos e estreptograminas. A resistência bacteriana pode ser devida à alteração enzimática do ribossoma, mediada por metilases, o que constitui o principal mecanismo de resistência (Fluit *et al.*, 2001) e que confere resistência cruzada a macrólidos, lincosamidas e

estreptogramina B (resistência que se designa MLS, de “macrolide-lincosamide-streptogramin”).

A **tetraciclina** é produzida por *Streptomyces aureofaciens* e é activa contra um grande número de bactérias Gram positivas e Gram negativas, clamídias, micoplasmas e rickettsias. O seu mecanismo de acção baseia-se na inibição da síntese proteica ao nível da subunidade 30S dos ribossomas, impedindo a ligação dos aminoacil-tRNAs aos ribossomas, impedindo a ligação codão-anticodão. É um antibiótico bacteriostático. A resistência bacteriana pode ser devida à fraca incorporação intracelular e ao elevado efluxo de antibiótico, mediado por proteínas TET, incorporadas na membrana citoplasmática bacteriana. Pode também ser devido a proteínas citoplasmáticas que protegem o ribossoma da acção da tetraciclina.

O **cloranfenicol** é produzido por *Streptomyces venezuelae* e é activo contra bactérias Gram positivas e Gram negativas. O seu mecanismo de acção baseia-se na inibição da síntese proteica ao nível da subunidade 50S, impedindo a transpeptidação. Tem um mecanismo bacteriostático. A resistência bacteriana pode ser devida a vários factores, entre os quais, a impermeabilização dos invólucros bacterianos.

A **vancomicina** pertence à classe de antimicrobianos glicopeptídeos e é um antibiótico antiparietal, ou seja, actua na biossíntese do mucopeptídeo ou peptidoglicano. É produzida por *Streptomyces orientalis* e tem acção contra a maioria das bactérias Gram positivas. O seu mecanismo de acção baseia-se na sua ligação específica ao dipeptídeo D-alanil-D-alanina do pentapeptídeo precursor do peptidoglicano (NAG-NAM-pentapeptídeo-P-P-lipídeo), na interface membrana citoplasmática/parede celular, impedindo a transferência de unidades recém-sintetizadas para a matriz parietal em crescimento.

10.1. Determinação de perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos por difusão em disco (Antibiogramas)

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos por difusão em disco, ou antibiogramas, é executado em placas de Petri, com meio de cultura sólido. A técnica baseia-se em semear por inundação uma placa com meio sólido (suspensão de bactérias semeada sobre toda a superfície do meio de cultura) e verificar se os discos de papel impregnados com antibiótico, colocados na placa, causam o aparecimento de um halo circular de inibição de crescimento bacteriano, à volta do disco, após a incubação.

Para cada antimicrobiano é registado o tamanho do halo em milímetros (quando há halo formado) e estes valores registados são depois comparados com os intervalos de valores publicados pelas normas NCCLS para *Streptococcus* spp. de origem veterinária (NCCLS, 2002) (ver Tabela 5).

Se a bactéria é resistente ao antimicrobiano não se forma halo de inibição ou há um halo de tamanho reduzido, correspondente a valores de susceptibilidade diminuída - resistência ou resistência intermédia, havendo crescimento bacteriano à volta do disco. No caso da bactéria ser sensível ao antimicrobiano, surge um halo de diâmetro maior que corresponde ao valor de sensibilidade ao antimicrobiano, havendo crescimento bacteriano à volta do disco (NCCLS, 2002).

Tabela 5. Valores dos halos de inibição de crescimento (em mm) para a interpretação da susceptibilidade aos antibióticos em *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *S. uberis*. De acordo com o “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS, 2002).

Antimicrobiano	Carga do disco (µg)	Resistente	Intermédio	Sensíveis
Pirlimicina (PIR)	2	≤12	-	≥13
Eritromicina (E)	15	≤15	16 – 20	≥21
Cloranfenicol (C)	30	≤17	18 – 20	≥21
Tetraciclina (TE)	30	≤18	19 – 22	≥23
Vancomicina (VA)	30	-	-	≥17

Foram utilizadas como estirpes controlo as estirpes *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619 e *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, para as quais estão publicados os valores aceitáveis (em mm), do diâmetro dos halos de inibição aos antibióticos utilizados no presente estudo (ver Tabelas 6 e 7).

Tabela 6. Diâmetros aceitáveis para os halos de inibição de crescimento para *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619. Proposto e publicado no “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS, 2002).

Antimicrobiano	Carga do disco (µg)	Diâmetro em mm
Pirlimicina (PIR)	2	-
Eritromicina (E)	15	25 – 30
Cloranfenicol (C)	30	23 – 27
Tetraciclina (TE)	30	27 – 31
Vancomicina (VA)	30	20 – 27

Tabela 7. Diâmetros aceitáveis para os halos de inibição de crescimento para *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923. Proposto e publicado no “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS, 2002).

Antimicrobiano	Carga do disco (µg)	Diâmetro em mm
Pirlimicina (PIR)	2	20 – 25
Eritromicina (E)	15	22 – 30
Cloranfenicol (C)	30	19 – 26
Tetraciclina (TE)	30	24 – 30
Vancomicina (VA)	30	17 – 21

Para a realização de antibiogramas de *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *S. uberis*, os isolados a testar, no primeiro dia, foram repicados em meio “Columbia” com 5% de sangue de carneiro em placa de Petri (bioMérieux®, Marcy l’Etoile, France), em aerobiose durante 18 a 24 horas para isolamento de colónias. No segundo dia, foi feita uma suspensão celular em 1 ml de meio líquido “Mueller-Hinton” (Difco, Becton Dickinson, France) (ver Materiais, ponto 1). Esta suspensão, deveria corresponder à densidade de 0,5 da escala de McFarland (bioMérieux®, Marcy l’Etoile, France). De acordo com as instruções do fabricante, o valor 0,5 da escala de McFarland corresponde a uma concentração bacteriana de 150×10^6 UFC/ml. Utilizou-se um tubo com 1 ml de meio

líquido “Mueller-Hinton” (Difco, Becton Dickinson, France) sem células, para controlo da esterilidade do meio. Utilizando zaragatoas estéreis, foi feita a inoculação da suspensão celular para placas de Petri com meio sólido “Mueller-Hinton” suplementado com 5% de sangue de carneiro (bioMérieux®, Marcy l'Etoile, France). A suspensão celular foi semeada sobre toda a superfície do meio de cultura de forma homogênea. Foram depois distribuídos por cada placa (por isolado) os discos de pirlimicina (2 µg), eritromicina (15 µg), cloranfenicol (30 µg), tetraciclina (30 µg) e vancomicina (30 µg) (Oxoid®, Basingstoke, England) (ver Tabela 4). A incubação foi realizada a 37 °C em aerobiose entre 20 a 24 horas.

Foram medidos os halos de inibição para cada antibiótico e foram registados os valores. Depois procedeu-se à interpretação da susceptibilidade (Tabela 5) e ficou registado se o isolado em causa apresentou susceptibilidade, susceptibilidade intermédia ou resistência a cada um dos antimicrobianos testados.

O procedimento experimental para as estirpes controlo foi essencialmente igual ao acima descrito, com algumas excepções.

Para o isolamento de colónias e confirmação da pureza das culturas conservadas de *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619 foi colocado um disco do antibiótico optoquina (Oxoid®, Basingstoke, England), antes de se realizar o antibiograma. A incubação foi realizada em atmosfera de anaerobiose a 37 °C.

O antibiograma de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 foi realizado em placas com meio sólido “Mueller-Hinton” (Difco, Becton Dickinson, France) sem suplemento de sangue (ver Materiais, ponto 1) (ver Fig. 5). Confirmou-se sempre se as estirpes controlo produziram os resultados esperados, de modo a se poder validar todo o procedimento experimental (ver Tabelas 6 e 7).

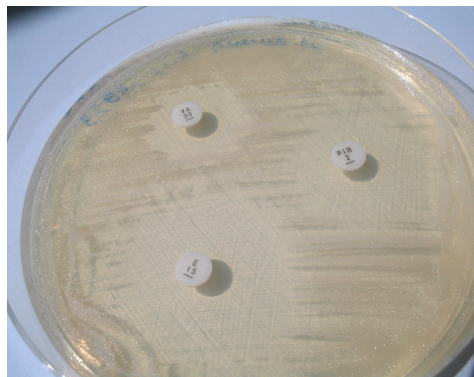


Figura 5. Teste de susceptibilidade a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923.

O antibiograma foi feito em placas de meio sólido “Mueller-Hinton” (Difco, Becton Dickinson, France) sem suplemento de sangue. Na figura estão representados os halos de inibição à PIR (2 µg), E (15 µg) e VA (30 µg) (Oxoid®, Basingstoke, England) (ver Tabela 8).

10.2. Método de avaliação de fenótipos de resistência a macrólidos - Teste do duplo disco

Os antimicrobianos macrólidos, lincosamidas e estreptograminas (MLS) ainda que estruturalmente diferentes, ligam-se à subunidade 50S do ribossoma em locais estreitamente relacionados, podendo resultar em resistência cruzada a estes antimicrobianos por parte das bactérias Gram positivas.

Um dos mecanismos descritos de resistência aos macrólidos é devido a modificações no rRNA 23S devido à enzima adenina- N^6 - metiltransferase. Estas modificações têm como resultado a alteração do local no rRNA 23S onde os antibióticos MLS_B (macrólidos, lincosamidas e estreptogramina B) se ligam. A modificação deste local do ribossoma confere resistência cruzada a estes antibióticos (fenótipo de resistência MLS_B). Este fenótipo é um dos mecanismos de resistência mais comuns (Fluit *et al.* 2001). Os genes que codificam para este tipo de enzimas (metilases) são designados genes *erm* (“erythromycin ribosome methylation”). A expressão da resistência MLS_B pode ser constitutiva (cMLS_B) ou indutível (iMLS_B). O tipo de resistência MLS_B não está relacionado com as diferentes classes de genes *erm* mas depende da sequência da região a montante do gene estrutural, codificador da metilase (Fluit *et al.*, 2001).

Para determinar os fenótipos de resistência a macrólidos, foi utilizado o teste do duplo disco baseado no método originalmente descrito por Seppälä *et al.* (1993), com os antimicrobianos eritromicina (representante de macrólidos) e clindamicina (representante de lincosamidas). Neste trabalho, foi usada a pirlimicina-PIR como representante de lincosamidas, por não existirem valores de referência (*breakpoints*) para a clindamicina, de acordo com as normas NCCLS (“National Committee for Clinical Laboratory Standards”) para *Streptococcus* spp. de origem veterinária (NCCLS, 2002).

No primeiro dia, os isolados de *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *S. uberis* a testar foram repicados em meio “Columbia” com 5% de sangue de carneiro em placa de Petri (bioMérieux®, Marcy l’Etoile, France), em aerobiose durante 18 a 24 horas para isolamento de colónias. No segundo dia, foi feita uma suspensão celular em 1 ml de meio líquido “Mueller-Hinton” (Difco, Becton Dickinson, France). Esta suspensão deve corresponder à densidade de 0,5 da escala de McFarland (bioMérieux®, Marcy l’Etoile, France). Utilizou-se um tubo com 1 ml de meio líquido “Mueller-Hinton” (Difco, Becton Dickinson, France) sem células, para controlo da esterilidade do meio. Utilizando zaragatoas estéreis, foi feita a inoculação da suspensão celular para placas de Petri com meio sólido “Mueller-Hinton” suplementado com 5% de sangue de carneiro (bioMérieux®, Marcy l’Etoile, France).

A suspensão de bactérias foi semeada sobre toda a superfície do meio de cultura de forma homogênea. Foram colocados na placa os discos de eritromicina (E 15 µg) e pirlimicina (PIR 2 µg) (Oxoid®, Basingstoke, England), ao centro e a distarem entre si 1,5 a 2 cm (ver Fig. 6).



Figura 6. Teste do duplo-disco (Seppälä *et al.*, 1993) para avaliação de fenótipos de resistência a macrólidos. Foram utilizados os discos de pirlimicina (PIR 2 µg) e eritromicina (E 15 µg) (Oxoid®, Basingstoke, England) a distarem entre si 1,5 a 2 cm em meio sólido “Mueller Hinton” com 5% de sangue de carneiro (bioMérieux®, Marcy l’Etoile, France).

No caso de um isolado apresentar fenótipo cMLS_B, observa-se na placa um halo de crescimento reduzido ou ausente em torno do disco de eritromicina e da pirlimicina. Os isolados iMLS_B, apresentam um halo de crescimento reduzido ou ausente em torno do disco da eritromicina, mas têm um halo de inibição à volta do disco da pirlimicina em forma de meia-lua, em que na metade proximal à eritromicina observa-se crescimento (não inibido pela pirlimicina), mas na metade distal à eritromicina observa-se uma zona onde o crescimento bacteriano é inibido pela presença da pirlimicina.

Outro mecanismo de resistência a macrólidos é devido a bombas de efluxo que são responsáveis pela expulsão do antimicrobiano da célula bacteriana, de forma a proteger o meio intracelular, em particular os ribossomas. O genes que codificam para este mecanismo de efluxo designam-se genes *mef* (“macrolide efflux”). Estes genes podem estar associados a elementos genéticos localizados no cromossoma e podem ser transferidos entre bactérias durante a conjugação (Luna *et al.*, 1999). A presença deste gene nos isolados de *Streptococcus* spp. resulta na resistência a macrólidos e susceptibilidade aos antimicrobianos lincosamidas e estreptogramina B (fenótipo M) (Roberts, *et al.*, 1999). Os isolados com este fenótipo devem apresentar um halo reduzido de inibição de crescimento (ou ausente) em torno do disco de eritromicina, mas em torno do disco de pirlimicina deve observar-se um halo de crescimento com diâmetro que corresponde a sensibilidade a este antimicrobiano.

Outro fenótipo, descrito recentemente em isolados de *S. agalactiae* de origem humana (Malbruny *et al.*, 2004), em isolados de *S. agalactiae* de origem bovina (Denamiel *et al.*, 2005) e ainda em *S. uberis* (Guérin-Faubleé *et al.*, 2002), caracteriza-se pela susceptibilidade à eritromicina (E) e resistência às lincosamidas (PIR) (fenótipo LSA de “lincosamide-streptogramin A”). Os isolados com este fenótipo apresentam um halo reduzido de inibição de crescimento (ou ausente) em torno do disco de PIR, mas em torno do disco de E observa-se um halo de crescimento com um diâmetro que corresponde a sensibilidade a este antimicrobiano.

10.3. Determinação de concentrações mínimas inibitórias (MIC) pelo método das microdiluições

Para determinar a concentração mínima inibitória, ou MIC (em µg/ml), de antibiótico que inibe o crescimento bacteriano utiliza-se meio de cultura líquido suplementado com concentrações crescentes do antibiótico. A cada um destes meios suplementados adiciona-se uma mesma quantidade de inóculo (suspensão bacteriana) e, após incubação a 37 °C, observa-se em que concentrações de antimicrobiano ocorreu crescimento bacteriano (pela turvação do meio).

A concentração mínima inibitória (MIC) é interpretada como sendo a diluição de concentração mais baixa que inibe o crescimento bacteriano após a incubação, não se observando turvação do meio. Este valor de concentração é comparado com o intervalo de valores, ou *breakpoints*, definidos segundo as normas do NCCLS (*National Committee for Clinically Laboratory Standard*), que indicam se o isolado deve ser considerado resistente ou susceptível ao antimicrobiano testado.

Neste estudo, os valores de MIC foram comparadas com *breakpoints* específicos para *Streptococcus* spp. de origem veterinária (NCCLS, 2002).

Foi determinado o valor do MIC para a vancomicina em todos os isolados para os quais os resultados dos antibiogramas deram halo de inibição de valor inferior a 17 mm (ver Tabela 5), ou seja, valores susceptibilidade diminuída à vancomicina (NCCLS, 2002).

No primeiro dia, os isolados de *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *S. uberis* a testar foram repicados em meio estéril “Columbia” com 5% de sangue de carneiro em placa de Petri (bioMérieux®, Marcy l’Etoile, France), em aerobiose durante 18 a 24 horas, para isolamento de colônias.

Partindo da solução *stock* do antimicrobiano vancomicina (Vancomycin Hydrochloride, Sigma®, Missouri, USA) (ver Materiais, ponto 1), fizeram-se sucessivas diluições (8 µg/ml, 4 µg/ml, 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,25 µg/ml e 0,125 µg/ml) em meio líquido “Mueller Hinton” (Difco, Becton Dickinson, France), com a finalidade de obter diferentes concentrações deste antimicrobiano. Neste intervalo de concentrações deve estar incluído o “breakpoint” deste antimicrobiano, definido nas normas NCCLS, para *Streptococcus* spp. de origem veterinária (ver Tabela 8).

Tabela 8. “Breakpoint” da concentração mínima inibitória (µg/ml) para a vancomicina em *Streptococcus* spp. de origem veterinária. Proposto e publicado no “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS, 2002).

Antibiótico	Resistente	Intermédio	Sensíveis
Vancomicina (VA)	-	-	≤1

A MIC para cada isolado foi interpretado como sendo a diluição de concentração mais baixa que demonstrou não apresentar crescimento microbiano visível, sem turvação do meio, após a incubação a 37 °C (ver Fig. 7).

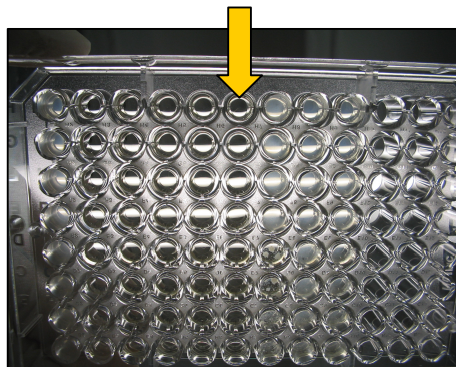


Figura 7. Placa MicroWell® (Nunc Surface®, Fisher Scientific, UK) utilizada na determinação da MIC para a vancomicina (VA) por microdiluições. Cada linha de micro-poços corresponde a concentrações diferentes de VA por isolado. A primeira coluna de micro-poços à esquerda corresponde a um controlo positivo do método experimental (inoculo sem antimicrobiano). A segunda coluna corresponde a um controlo negativo, apenas meio líquido “Mueller Hinton” (Difco, Becton Dickinson, France). A seta laranja aponta para a diluição de concentração mais baixa que demonstrou não apresentar crescimento microbiano visível (MIC).

No primeiro dia, os isolados de *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *S. uberis* a testar foram repicados em meio estéril “Columbia” com 5% de sangue de carneiro em placa de Petri (bioMérieux®, Marcy l’Etoile, France), em aerobiose durante 18 a 24 horas, para isolamento de colónias. No segundo dia, foram retiradas algumas colónias com uma zaragatoa estéril e foram feitas suspensões celulares em 5 ml de tampão PBS (“Phosphate Buffered Saline”) (ver Materiais, ponto 1). Desta suspensão foi pipetado 1 ml para uma cuvette para leitura da absorvância no espectrofotómetro a 600 nm.

De acordo com a densidade óptica e utilizando rectas de calibração, elaboradas com isolados de cada uma das espécies, foi calculado o volume a ser retirado de cada uma das suspensões celulares para se obter uma concentração celular aproximada de 1×10^8 UFC/ml (NCCLS, 2002). Este volume é diluído em meio líquido “Mueller Hinton” (Difco, Becton Dickinson, France) (ver Materiais, ponto 1), sempre à proporção de 1/10, até ser obtida uma suspensão celular que corresponda aproximadamente a 5×10^6 UFC/ml. É então inoculada a placa MicroWell (Nunc Surface®, Fisher Scientific, UK) com 100 µl desta suspensão. As placas foram incubadas a 37 °C durante 20 horas.

Para controlo da concentração final de inóculo de cada isolado, foram retirados 10 µl de inóculo do controlo positivo da placa MicroWell® para tubos de ensaio com 10 ml de soro fisiológico (ver Materiais, ponto 1) e foram retirados 100 µl desta suspensão para uma placa de meio “Columbia” com 5% de sangue de carneiro (bioMérieux®, Marcy l’Etoile, France), semeando o inóculo sobre toda a superfície do meio de cultura. Após incubação a 37 °C durante 20 horas, contaram-se cerca de 50 colónias que indica uma densidade de inóculo de 5×10^5 UFC/ml, segundo as normas do NCCLS (2002).

Foi utilizada a estirpe *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213 (ver Tabela 2) para controlo da qualidade experimental. Esta estirpe controlo foi testada sob as mesmas condições que os isolados de *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *S. uberis*. O intervalo aceitável de controlo da qualidade para a MIC no caso da estirpe de referência *S. aureus* ATCC® 29213 é entre 0,5 e 2 µg/ml (NCCLS, 2002).

11. Pesquisa de genes associados à resistência aos antimicrobianos e genes associados à virulência em *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *S. uberis*, por PCR

Foram pesquisados, por PCR, em *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *S. uberis*, os seguintes genes: *mef(A)*, *erm(A)*, *erm(B)*, associados à resistência aos macrólidos e os genes *tet(M)*, *tet(T)*, *tet(O)*, *tet(W)*, *tet(L)*, *tet(Q)*, *tet(K)* e *tet(S)*, associados à resistência à tetraciclina.

Foram pesquisados, por PCR, em todos os isolados *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, os seguintes genes associados à virulência: *speA*, *speC* e *ssa*, que codificam para toxinas superantigénicas. Estes genes são codificados por genomas fágicos de *Streptococcus pyogenes* (ou *Streptococcus* do grupo A) (Cunningham, 2000).

As condições de reacção de amplificação PCR e sequências iniciadoras ou primers, usadas para amplificação dos genes *speA* e *speC*, foram realizadas como descritas em Jasir *et al.*, (2001). As condições de reacção de amplificação PCR e sequências iniciadoras ou primers, usadas para amplificação do gene *ssa*, foram realizadas como descritas em Reda *et al.*, (1994).

11.1. Isolamento de DNA para pesquisa por PCR de genes de resistência a antimicrobianos e genes de virulência

O DNA dos isolados foi extraído segundo o protocolo descrito por Klugman *et al.*, (1998). Todos os isolados de *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *S. uberis* foram repicados para meio “Columbia” com 5% de sangue de carneiro em placa de Petri (bioMérieux®, Marcy l’Etoile, France) e incubados em aerobiose durante 18 a 24 horas para isolamento de colónias. Algumas colónias foram transferidas com ansa e ressuspensas em 300 µl de tampão de extracção de DNA (10 mM Tris, pH 8,5) (ver Métodos, ponto 1). As suspensões celulares foram fervidas durante 10 minutos e centrifugadas em microcentrifuga (Biofuge Pico, Heraeus Instruments, Hanau, Germany), a 13000 rpm durante 5 minutos. Os sobrenadantes contendo os DNAs foram transferidos para novos microtubos e armazenados a -20 °C.

Foram também utilizados DNAs em discos de agarose, preparados para realizar a técnica de PFGE (ver ponto 7.3.) (O. Melter. National Institute of Public Health. Prague, the Czech Republic. Comunicação pessoal). Cada disco, contendo o DNA, foi aquecido a 70 °C. Juntou-se 180 µl de água bidestilada autoclavada. Esta suspensão foi aquecida a 95 °C, durante 15 minutos, e logo de seguida foi colocada em gelo. Esta suspensão contendo o DNA foi armazenada a -20 °C. Foram utilizados 2 µl de DNA extraído por este método, por tubo, com a mistura para PCR. Neste caso, foi retirado 1 µl de água ao tubo de mistura de reacção de PCR de forma a não alterar as condições de reacção descritas nas Tabelas 9, 10 e 11.

11.2. Condições de reacção de amplificação e sequências iniciadoras

As condições de reacção de amplificação PCR e sequências iniciadoras ou primers, usadas para amplificação dos genes *mef(A)*, *erm(A)*, *erm(B)*, *tet(M)*, *tet(T)*, *tet(O)*, *tet(W)* e *tet(Q)* foram realizadas como descritas em Pires *et al.* (2005). As condições de reacção de amplificação PCR e sequências iniciadoras ou primers, usadas para amplificação para os genes *tet(L)*, *tet(K)* e *tet(S)*, foram realizadas como descritas em Aminov *et al.* (2001) e Ng *et al.* (2001).

Em cada tubo de mistura para PCR (“*Master Mix*”) foi colocado o volume de água bidestilada autoclavada. A mistura de reacção foi feita, separadamente, com o tampão de reacção (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania), todos os dNTP’s (dNTP *Mix*) (10 mM MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania), “primers” directo (FOR de “forward”) e inverso (REV de “reverse”), específicos para cada gene (ver Tabela 12), e 25 mM MgCl₂ (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania), nas concentrações indicadas conforme descrito nas Tabelas 9, 10 e 11. A “*Master Mix*” foi centrifugada em microcentrifuga (Biofuge Pico, Heraeus Instruments, Hanau, Germany), a 13000 rpm durante alguns segundos, e distribuída equitativamente por todos os tubos PCR. Foi adicionado 1 µl de DNA de cada isolado a cada tubo de PCR. Após breve centrifugação, durante alguns segundos a 13000 rpm, para mistura de todos os componentes, foi adicionada a enzima *Taq* Polimerase (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania) a cada tubo PCR, no volume indicado conforme descrito nas Tabelas 9, 10 e 11.

Tabela 9. Condições de reacção de PCR para amplificação de genes associados a resistência à tetraciclina

	<i>tet(M)</i> (Marchese <i>et al.</i> , 1998)		<i>tet(O)</i> (Ng. <i>et al.</i> , 2001)		<i>tet(T)</i> (Aminov <i>et al.</i> , 2001)		<i>tet(W)</i> (Aminov <i>et al.</i> , 2001)		<i>tet(L)</i> (Ng. <i>et al.</i> , 2001)		<i>tet(Q)</i> (Ng. <i>et al.</i> , 2001)		<i>tet(K)</i> (Ng. <i>et al.</i> , 2001)		<i>tet(S)</i> (Aminov <i>et al.</i> , 2001)	
Reagente	[] final	Vol./ tubo (μ l)	[] final	Vol./ tubo (μ l)	[] final	Vol./ tubo (μ l)	[] final	Vol./ tubo (μ l)	[] final	Vol./ tubo (μ l)	[] final	Vol./ tubo (μ l)	[] final	Vol./ tubo (μ l)	[] final	Vol./ tubo (μ l)
Tampão de reacção 10X	1X	5	1X	5	1X	2	1X	2	1X	5	1X	5	1X	5	1X	2
dNTP's Mix 10 mM	0,2 mM	1	0,3 mM	1,5	0,1 mM	0,2	0,1 mM	0,2	0,3 mM	1,5	0,3 mM	1,5	0,3 mM	1,5	0,1 mM	0,2
“Primer FOR”	1 μ M	0,5	1,25 μ M	0,625	1,25 μ M	0,25	1,25 μ M	0,25	1 μ M	0,5	1,25 μ M	0,625	1,25 μ M	0,625	1,25 μ M	0,25
“Primer REV”	1 μ M	0,5	1,25 μ M	0,625	1,25 μ M	0,25	1,25 μ M	0,25	1 μ M	0,5	1,25 μ M	0,625	1,25 μ M	0,625	1,25 μ M	0,25
MgCl ₂ 25 mM	2 mM	4	3 mM	6	2 mM	1,6	2 mM	1,6	3 mM	6	1,5 mM	3	3 mM	6	2 mM	1,6
H ₂ O	-	37,5	-	34,75	-	14,5	-	14,5	-	35	-	37,75	-	34,75	-	14,5
DNA	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1
<i>Taq</i> Polimerase	2,5 U	0,5	2,5 U	0,5	1 U	0,2	1 U	0,2	2,5 U	0,5	2,5 U	0,5	2,5 U	0,5	1 U	0,2

As reacções foram feitas em 50 μ l de volume, excepto para os genes *tet(T)*, *tet(W)* e *tet(S)*, que foram feitas num total de 20 μ l;
[]final -A concentração final de cada reagente num volume de 50 μ l/ ou 20 μ l no caso dos genes *tet(T)*, *tet(W)* e *tet(S)*; Vol.- Volume;
“Primer FOR” = “Primer Foward” (Directo); “Primer REV” = “Primer Reverse” (Inverso).

Tabela 10. Condições de reacção de PCR para genes associados a resistência aos macrólidos.

Reagente	<i>mef(A)</i> (Oster <i>et al.</i> , 1999)		<i>erm(A)</i> (Cresti <i>et al.</i> , 2002)		<i>erm(B)</i> (Marchese <i>et al.</i> , 1998)	
	[] final	Volume/ tubo (µl)	[] final	Volume/ tubo (µl)	[] final	Volume/ tubo (µl)
Tampão de reacção 10X	1X	5	1X	5	1X	5
10 mM dNTP's Mix	0,2 mM	1	200 µM	1	0,2 mM	1
“Primer FOR”	1 µM	0,5	1 µM	0,5	1 µM	0,5
“Primer REV”	1 µM	0,5	1 µM	0,5	1 µM	0,5
25 mM MgCl ₂	2,5 mM	5	1,5 mM	3	2 mM	4
H ₂ O	-	36,8	-	38,8	-	37,5
DNA	-	1	-	1	-	1
<i>Taq</i> Polimerase 5 U/µl	1 U	0,2	1 U	0,2	2,5 U	0,5

As reacções foram feitas em 50 µl de volume;

[] final = Concentração final de cada reagente num volume de 50 µl;

“Primer FOR” = “Primer Forward” (Directo); “Primer REV” = “Primer Reverse” (Inverso).

Tabela 11. Condições de reacção de PCR para genes associados a virulência.

Reagente	<i>speA, speC</i> (Jasir <i>et al.</i> , 2001)		<i>ssa</i> (Reda <i>et al.</i> , 1994)	
	[] final	Volume/ tubo (µl)	[] final	Volume/ tubo (µl)
Tampão de reacção 10X	1X	5	1X	5
10 mM dNTP's Mix	0,2 mM	1	0,1 mM	0,5
“Primer FOR”	1 µM	0,5	0,4 µM	0,2
“Primer REV”	1 µM	0,5	0,4 µM	0,2
25 mM MgCl ₂	2,5 mM	5	1,5 mM	3
H ₂ O	-	36,8	-	39,9
DNA	-	1	-	1
<i>Taq</i> Polimerase 5 U/µl	1 U	0,2	1 U	0,2

As reacções foram feitas em 50 µl de volume;

[] final = Concentração final de cada reagente num volume de 50 µl;

“Primer FOR” = “Primer Forward” (Directo); “Primer REV” = “Primer Reverse” (Inverso).

Foram utilizados, em todos os ensaios, estirpes controlo positivo, que contêm no seu genoma o gene a ser pesquisado (ver estirpes controlo para PCR na Tabela 3) de modo a validar o procedimento experimental. Foram também utilizados controlos negativos, ou seja, estirpes que se sabia não possuírem o gene em estudo. Cada resultado negativo foi repetido duas vezes, em ensaios independentes.

As condições de amplificação são específicas para cada gene em estudo, conforme descrito na Tabela 13.

Tabela 12. “Primers” ou sequências iniciadoras, utilizados na detecção de genes de resistência a antimicrobianos e genes de virulência.

“Primers”	Sequência 5’ para 3’	Produto de amplificação (pb)	Referência bibliográfica
<i>mef(A)</i> FOR	5’-GACCAAAAGCCACAATTGTGGA-3’	1432	Cresti (2002)
<i>mef(A)</i> REV	5’-CCTCCTGTCTATAATCGCATG-3’		Cresti (2002)
<i>erm(A)</i> FOR	5’-CCCGAAAAATACGCAAAATTTTCAT-3’	590	Cresti (2002)
<i>erm(A)</i> REV	5’-CCCTGTTTACCCATTTATAAACG-3’		Cresti (2002)
<i>erm(B)</i> FOR	5’-GGAGTGATACATGAACAAAAATA-3’	531	Cascone <i>et al.</i> (2002)
<i>erm(B)</i> REV	5’-TTCCTTTTAGTAACGTGTAACCTT-3’		Cascone <i>et al.</i> (2002)
<i>tet(M)</i> FOR	5’-TGGAATTGATTTATCAACGG-3’	1080	Marchese <i>et al.</i> (1998)
<i>tet(M)</i> REV	5’-TTCCAACCATAACAATCCTTG-3’		Marchese <i>et al.</i> (1998)
<i>tet(O)</i> FOR	5’-AACTTAGGCATTCTGGCTCAC-3’	515	Ng. <i>et al.</i> (2001)
<i>tet(O)</i> REV	5’-TCCCACTGTTCCATATCGTCA-3’		Ng. <i>et al.</i> (2001)
<i>tet(T)</i> FOR	5’-AAGGTTTATTATATAAAAAGTG-3’	169	Aminov <i>et al.</i> (2001)
<i>tet(T)</i> REV	5’-AGGTGTATCTATGATATTTAC-3’		Aminov <i>et al.</i> (2001)
<i>tet(W)</i> FOR	5’-GAGAGCCTGCTATATGCCAGC-3’	168	Aminov <i>et al.</i> (2001)
<i>tet(W)</i> REV	5’-GGGCGTATCCACAATGTTAAC-3’		Aminov <i>et al.</i> (2001)
<i>tet(L)</i> FOR	5’-TCGTTAGCGTGCTGTCATTC-3’	267	Ng. <i>et al.</i> (2001)
<i>tet(L)</i> REV	5’-GTATCCCACCAATGTAGCCG-3’		Ng. <i>et al.</i> (2001)
<i>tet(Q)</i> FOR	5’-TTATACTTCCTCCGGCATCG-3’	904	Ng. <i>et al.</i> (2001)
<i>tet(Q)</i> REV	5’-ATCGGTTGAGAATGTCCAC-3’		Ng. <i>et al.</i> (2001)
<i>tet(K)</i> FOR	5’-TCGATAGGAACAGCAGTA-3’	169	Ng. <i>et al.</i> (2001)
<i>tet(K)</i> REV	5’-CAGCAGATCCTACTCCTT-3’		Ng. <i>et al.</i> (2001)
<i>tet(S)</i> FOR	5’-GAAAGCTTACTATACAGTAGC-3’	169	Aminov <i>et al.</i> (2001)
<i>tet(S)</i> REV	5’-AGGAGTATCTACAATATTTAC-3’		Aminov <i>et al.</i> (2001)
<i>speA</i> FOR	5’-CTTAAGAACCAAGAGATGGC-3’	200	Jasir <i>et al.</i> (2001)
<i>speA</i> REV	5’-ATAGGCTTTGGATACCATCG-3’		Jasir <i>et al.</i> (2001)
<i>speC</i> FOR	5’-CATCTATGGAGGAATTACGC-3’	231	Jasir <i>et al.</i> (2001)
<i>speC</i> REV	5’-TGTGCCAATTTTCGATTCTGC-3’		Jasir <i>et al.</i> (2001)
<i>ssa</i> FOR	5’-AGTCAGCTGACCCTAC-3’	691	Reda <i>et al.</i> (1994)
<i>ssa</i> REV	5’-TAAGGTGAACCTCTAT-3’		Reda <i>et al.</i> (1994)

“Primer FOR” = “Primer Forward” (Directo); “Primer REV” = “Primer Reverse” (Inverso).

11.3. Visualização dos amplicões

Após amplificação, os produtos de PCR foram submetidos a uma electroforese em gel de agarose (Gibco BRL™, Life Technologies, Grand Island, USA) a 1% em TAE 1X (Sambrook J and DW Russell, 2001) (ver Materiais, ponto 1), com 0,05 µl de brometo de etídeo por mililitro de agarose.

Foram colocados em cada poço do gel de agarose 2 µl de DNA amplificado (amplicão), 2 µl de tampão de arrastamento azul de bromofenol (ver Materiais, ponto 1) e 4 µl de água bidestilada estéril. Foi utilizado o marcador de massa molecular O’GeneRuler™, 100 bp DNA Ladder, (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania) nos dois poços laterais do gel (ver Fig. 3) para confirmação do tamanho (pb) do amplicão. A electroforese decorreu durante 50 min. a 100 V.

A imagem do gel foi depois visualizada num transiluminador (BioRad, California, USA) e captada utilizando o programa “Quantity One” (“Software Quantity One®”).

Tabela 13. Condições utilizadas no termociclador para amplificação por PCR de genes de resistência a antimicrobianos e genes de virulência.

Gene	Desnaturação inicial*		Desnaturação		Emparelhamento		Extensão		Extensão final*		Número de ciclos	Referência bibliográfica
	T	t	T	t	T	t	T	t	T	t		
<i>mef(A)</i>			94 °C	30 s	58 °C	60 s	72 °C	80 s			40	Cresti (2002)
<i>erm(A)</i>			94 °C	30 s	48 °C	60 s	72 °C	30 s			40	Cresti (2002)
<i>erm(B)</i>	94 °C	5 m	94 °C	30 s	53 °C	30 s	72 °C	90 s	72 °C	7 m	30	Marchese <i>et al.</i> (1998)
<i>tet(M)</i>	94 °C	5 m	94 °C	30 s	53 °C	30 s	72 °C	90 s	72 °C	7 m	30	Marchese <i>et al.</i> (1998)
<i>tet(O)</i>	94 °C	5 m	94 °C	1 m	55 °C	1 m	72 °C	90 s			35	Ng. <i>et al.</i> (2001)
<i>tet(T)</i>	94 °C	5 m	94 °C	30 s	46 °C	30 s	72 °C	30 s	72 °C	7 m	25	Aminov <i>et al.</i> (2001)
<i>tet(W)</i>	94 °C	5 m	94 °C	30 s	64 °C	30 s	72 °C	30 s	72 °C	7 m	25	Aminov <i>et al.</i> (2001)
<i>tet(L)</i>	94 °C	5 m	94 °C	1 m	55 °C	1 m	72 °C	90 s			35	Ng. <i>et al.</i> (2001)
<i>tet(Q)</i>	94 °C	5 m	94 °C	1 m	55 °C	1 m	72 °C	90 s			35	Ng. <i>et al.</i> (2001)
<i>tet(K)</i>	94 °C	5 m	94 °C	1 m	55 °C	1 m	72 °C	90 s			35	Ng. <i>et al.</i> (2001)
<i>tet(S)</i>	94 °C	5 m	94 °C	30 s	50 °C	30 s	72 °C	30 s	72 °C	7 m	25	Aminov <i>et al.</i> (2001)
<i>speA</i>			94 °C	1 m	58 °C	2 m	72 °C	1 m			35	Jasir <i>et al.</i> (2001)
<i>speC</i>			94 °C	1 m	58 °C	2 m	72 °C	1 m			35	Jasir <i>et al.</i> (2001)
<i>ssa</i>			95 °C	1 m	55 °C	2 m	72 °C	3 m			25	Reda <i>et al.</i> (1994)

T = temperatura; t = tempo.

*Desnaturação inicial e Extensão final, não fazem parte dos ciclos descritos, só ocorrem uma vez.

12. “Multilocus Sequence Typing” (MLST) de *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus uberis*

A estrutura da população de *S. agalactiae* e *S. uberis* foi determinada por análise de sequências de múltiplos *loci* ou MLST (“Multilocus Sequence Typing” (Maiden *et al.*, 1998) - www.mlst.net/), de forma a comparar a base genómica de isolados destas duas espécies com outros isolados provenientes de outros Países.

Para a realização desta técnica foram seleccionados isolados de *S. agalactiae* e *S. uberis*. Foram escolhidos seis isolados *S. agalactiae* e nove isolados *S. uberis* representativos, de acordo com os dendrogramas construídos com todos os perfis dos isolados de cada espécie (ver Resultados).

O perfil alélico dos isolados *S. agalactiae* e *S. uberis* testados foi obtido através da sequenciação dos fragmentos internos de sete genes nativos, ou *housekeeping*, de acordo com os métodos descritos para estas duas espécies e disponíveis nas bases de dados públicas em pubmlst.org/sagalactiae/ e pubmlst.org/suberis/.

Para *S. agalactiae* os sete genes nativos ou *housekeeping* amplificados foram: “*alcohol dehydrogenase*” (*adhP*); “*phenylalanyl tRNA synthetase*” (*Phes*); “*glutamine transporter protein*” (*atr*); “*glutamine synthetase*” (*glnA*); “*serine dehydratase*” (*sdhA*); “*glucose kinase*” (*glcK*); “*transketolase*” (*tkl*) (<http://pubmlst.org/sagalactiae/>; Jones *et al.*, 2003).

Para *S. uberis*, os sete genes nativos ou *housekeeping* amplificados foram: “*carbamate kinase*” (*arcC*); “*D-ala-D-ala ligase*” (*ddl*); “*glucose kinase*” (*gki*); “*transketolase*” (*recP*); “*Thymidine kinase*” (*tdk*); “*triosephosphate isomerase*” (*tpi*); “*acetyl CoA acetyl-transferase*” (*yqiL*) (pubmlst.org/suberis/; Coffey *et al.*, 2006).

Para cada *locus*, cada sequência nucleotídica diferente é considerada como um alelo diferente, ao qual se atribui um número. Cada isolado é definido por um perfil alélico, correspondendo aos alelos dos sete *loci* considerados. Isolados que apresentem o mesmo perfil alélico são considerados como pertencentes à mesma sequência-tipo, ou ST (“Sequence Type”).

O perfil alélico para *S. agalactiae* corresponde aos alelos dos sete *loci* pela seguinte ordem: *adhP*, *phes*, *atr*, *glnA*, *sdhA*, *glcK*, *tkl*.

O perfil alélico para *S. uberis* corresponde aos alelos dos sete *loci* pela seguinte ordem: *arcC*, *ddl*, *gki*, *recP*, *tdk*, *tpi*, *yqiL*.

12.1. Isolamento de DNA para amplificação de genes “housekeeping” para MLST

O DNA dos isolados a estudar foi extraído segundo o protocolo descrito para a técnica de MLST de *Streptococcus pyogenes*, em <http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/doc.htm>.

Os isolados de *S. agalactiae* e *S. uberis* foram repicados em meio “Columbia” com 5% de sangue de carneiro em placa de Petri (bioMérieux®, Marcy l’Etoile, France), em aerobiose durante 18 a 24 horas para isolamento de colônias.

No dia seguinte algumas colônias foram transferidas com ansa para 300 µl de solução 0,85% NaCl (ver Materiais, ponto 1). Esta suspensão foi aquecida a 70 °C durante 15 minutos. Foi centrifugada em microcentrifuga (Biofuge Pico, Heraeus Instruments, Hanau, Germany), a 13000 rpm durante 2 minutos, e retirado o sobrenadante. A ressuspensão do sedimento foi feita em 62 µl de solução de lise celular (ver Tabela 14 e Materiais, ponto 1), preparada no momento de utilização. Esta ressuspensão foi incubada a 37 °C durante 30 minutos em banho seco. Foi depois aquecida a 100 °C durante 10 minutos e centrifugada em microcentrifuga (Biofuge Pico, Heraeus Instruments, Hanau, Germany) a 13000 rpm durante 1 minuto. O sobrenadante contendo o DNA foi guardado em microtubos a -20 °C.

Tabela 14. Solução de lise celular para isolamento de DNA de *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus uberis*

Reagente	[] final	Volume (µl)
TE 1X (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8)	8,1 mM Tris, 0,81 mM EDTA	50
Mutanolisina (3 U/µl) (ver ponto 1)	30 U	10
Hialuronidase (30 mg/ml) (ver ponto 1)	1 µg/µl	2

Volume final: 62 µl por isolado. A solução de lise é preparada no momento de utilização, segundo o protocolo de MLST para *Streptococcus pyogenes*, em <http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/doc.htm>

12.2. Condições de reacção de amplificação por PCR de genes nativos para MLST

Em cada tubo de mistura de reacção para PCR foi colocado o volume de água bidestilada autoclavada (ver Tabela 15). A “Master Mix” foi feita em separado com o tampão de reacção (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania), dNTP Mix, 10 mM (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania) “primers” directo (FOR de “forward”) e inverso (REV de “reverse”) específicos para cada um dos sete genes (Tabelas 16 e 17 e Materiais, ponto 1) e 25 mM MgCl₂ (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania), nas concentrações indicadas conforme descrito na Tabela 15. A “Master Mix” foi centrifugada em microcentrifuga (Biofuge Pico, Heraeus Instruments, Hanau, Germany), a 13000 rpm durante alguns segundos, e distribuída equitativamente por todos os tubos de PCR. Adicionou-se o DNA de cada isolado a cada tubo de PCR. Após centrifugação dos tubos PCR em microcentrifuga (Biofuge Pico, Heraeus Instruments, Hanau, Germany), a 13000 rpm durante alguns segundos, foi adicionada a enzima *Taq* Polimerase (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania) a cada tubo PCR (ver Tabela 15).

Tabela 15. Condições de reacção de PCR para amplificação dos sete genes “housekeeping” de *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus uberis*, para a técnica MLST.

MLST <i>S. agalactiae</i> (adaptado de http://sagalactiae.mlst.net/ ; Jones <i>et al.</i> , 2003)			MLST <i>S. uberis</i> (adaptado de http://pubmlst.org/suberis/)	
Reagente	[] final	Volume/ tubo (µl)	[] final	Volume/ tubo (µl)
Tampão de reacção 10X	1X	5	1X	5
10 mM dNTP's Mix	0,4 mM	2	200 µM	1
“Primer FOR”	100 pmol	1	30 pmol	0,3
“Primer REV”	100 pmol	1	30 pmol	0,3
25 mM MgCl ₂	3 mM	6	1,5 mM	3
H ₂ O	-	31,8	-	38,15
DNA	-	3	-	2
<i>Taq</i> Polimerase 5 U/µl	0,5 U	0,2	1,25	0,25

As reacções foram feitas em 50 µl de volume;

[] final = Concentração final de cada reagente num volume de 50 µl;

“Primer FOR” = “Primer Forward” (Directo); “Primer REV” = “Primer Reverse” (Inverso).

Tabela 16. “Primers” ou sequências iniciadoras utilizadas para MLST de *Streptococcus agalactiae*. Neste caso, os “primers” para amplificação são distintos dos “primers” para sequenciação. Segundo <http://pubmlst.org/sagalactiae/>.

“Locus”		“FOR” (5’ para 3’)	“REV” (5’ para 3’)	Tamanho esperado dos amplicões (pb)
<i>adhP</i>	amplificação	GTTGGTCATGGTGAAGCACT	ACTGTACCTCCAGCACGAAC	672
	sequenciação	GGTGTGTGCCATACTGATTT	ACAGCAGTCACAACCACTCC	498
<i>pheS</i>	amplificação	GATTAAGGAGTAGTGGCACG	TTGAGATCGCCCATTGAAAT	723
	sequenciação	ATATCAACTCAAGAAAAGCT	TGATGGAATTGATGGCTATG	501
<i>atr</i>	amplificação	CGATTCTCTCAGCTTTGTTA	AAGAAATCTCTTGTGCGGAT	627
	sequenciação	ATGGTTGAGCCAATTATTTT	CCTTGCTCAACAATAATGCC	501
<i>glnA</i>	amplificação	CCGGCTACAGATGAACAATT	CTGATAATTGCCATTCCACG	589
	sequenciação	AATAAAGCAATGTTTGATGG	GCATTGTTCCCTTCATTATC	498
<i>sdhA</i>	amplificação	AGAGCAAGCTAATAGCCAAC	ATATCAGCAGCAACAAGTGC	646
	sequenciação	AACATAGCAGAGCTCATGAT	GGGACTTCAACTAAACCTGC	519
<i>glcK</i>	amplificação	CTCGGAGGAACGACCATTAA	CTTGTAACAGTATCACCGTT	607
	sequenciação	GGTATCTTGACGCTTGAGGG	ATCGCTGCTTTAATGGCAGA	459
<i>tkt</i>	amplificação	CCAGGCTTTGATTTAGTTGA	AATAGCTTGTGGCTTGAAA	859
	sequenciação	ACACTTCATGGTGTATGGTTG	TGACCTAGGTCATGAGCTTT	480

“FOR” = “Primer Forward” (Direto); “REV” = “Primer Reverse” (Inverso).

Tabela 17. “Primers” ou sequências iniciadoras utilizadas para MLST de *Streptococcus uberis*. Neste caso, os “primers” utilizados para amplificação e sequenciação são os mesmos. Segundo <http://pubmlst.org/suberis/>.

Gene	T _a (°C)	Produto de amplificação (pb)	Sequências (5’ para 3’)	Produto de sequenciação (pb)
<i>gki</i>	55	564	GACCGGACCCAAAACACAGTCACAGGTGCTTTT	455
			AAGAGAATCTGGATTTAGGATATTTGAAATATT	
<i>recP</i>	60	531	AATTCAGGTCACCCTGGCTTACCAATGGGTGCAGCC	372
			TGTGAAAGCCATTGATGTTGGACCATCAAGTGAAAT	
<i>ddl</i>	60	503	GTCTATATTGAAGGTAATGACTTGGAAGACTGT	357
			TACATGGACCACTGAGTGAATCCAGGCATAGTATTC	
<i>tdk</i>	55	793	TATTTTCATTTTCATAATAAGTTAGTGGATTTAGTAA	500
			TTGATCATATATATTCATGTTATGAATCGTTCTCCT	
<i>arcC</i>	55	518	GTTTGTGACGCAAAATCTTTATCGATAACA	419
			ACTCATGGTAACGGACCACAAGTTGGTAAC	
<i>tpi</i>	60	471	GTTATTGGTCATTCAGAACGTCGTGATTACTTC	373
			GTCAAGTAATGCTAAGAAGCTATCTGCTTCAAGTGA	
<i>yqiL</i>	55	574	TTTCTTCTTTGAAACGATTATTTTAAAGTGCTTCAG	439
			CAAGCTCTAAGAACACCAATTGGTGCATTCCGAGGA	

T_a (°C) – Temperatura de “annealing” ou de emparelhamento. As condições de amplificação para os diferentes genes de *S. uberis* variam quanto à temperatura de emparelhamento.

As condições de amplificação dos genes “housekeeping” de *S. agalactiae* foram as seguintes: desnaturação a 94 °C durante 1 minuto; emparelhamento a 55 °C durante 45

segundos; extensão a 72 °C durante 1 minuto; 30 ciclos (<http://sagalactiae.mlst.net/>; Jones *et al.*, 2003).

As condições de amplificação dos genes “housekeeping” de *S. uberis* foram as seguintes: desnaturação inicial a 94 °C durante 5 minutos; desnaturação a 94 °C durante 30 segundos; emparelhamento às temperaturas específicas para cada um dos sete genes (T_a), descritas na Tabela 17, durante 30 segundos; extensão a 72 °C durante 45 segundos; extensão final a 72 °C durante 7 minutos; 40 ciclos (<http://pubmlst.org/suberis/>). A desnaturação inicial e a extensão final não fazem parte dos 40 ciclos, só ocorrem uma vez.

12.3. Visualização das amplificações

Após amplificação, os produtos de PCR foram submetidos a uma electroforese em gel de agarose (Gibco BRL™, Life Technologies, Grand Island, USA) a 1% em tampão TAE 1X (ver Materiais, ponto 1) com 0,05 µl de brometo de etídeo por mililitro de agarose.

Foram colocados em cada poço 2 µl de amplicão, 2 µl de tampão de arrastamento azul de Bromofenol (ver Materiais, ponto 1) e 4 µl de água bidestilada. Foi utilizado o marcador de massa molecular O'GeneRuler™, 100 bp DNA Ladder, (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania), nos dois poços laterais do gel de agarose (ver Fig. 3) para confirmação do tamanho (pb) do amplicão. A electroforese decorreu durante 50 minutos a 100 V.

A imagem do gel foi depois visualizada num transiluminador (BioRad, California, USA) e captada utilizando o programa “Quantity One” (“Software: Quantity One®”).

12.4. Purificação dos amplicões para sequenciação

Foi utilizado o sistema comercial de purificação Wizard® PCR Preps DNA Purification System (Promega, USA) que inclui tampão de purificação (“Direct PCR Purification Buffer”), um frasco com resina, mini-colunas com filtros (Wizard® Minicolumn) e seringas. O método de purificação do DNA foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

Cada amplicão (50 µl) foi misturado em 100 µl de tampão de purificação colocado em microtubo e foi agitado no vórtex durante alguns segundos. Foi adicionado, a esta mistura, 1 ml de resina que deve estar à temperatura de 50 °C no momento de utilização. Esta mistura foi agitada no vórtex três vezes, com um minuto de intervalo entre cada agitação. Entretanto, foi colocado no aparelho de vácuo (Promega, USA) uma seringa de 2 ml sobre uma mini-coluna. Após a agitação, a mistura foi colocada na seringa de 2 ml e, com a ajuda do êmbolo, foi empurrada através da mini-coluna. Foi adicionado à seringa 2 ml de isopropanol (2-Propanol) (Merck, Darmstadt, Germany) a 80%, diluído em água bidestilada. Com o êmbolo voltou a empurrar-se o conteúdo da seringa pela mini-coluna para lavagem do DNA retido no filtro da mini-coluna. A coluna foi depois centrifugada em microcentrifuga (Biofuge Pico, Heraeus Instruments, Hanau, Germany), a 8000 rpm durante 2 minutos, para remover todo o excesso de isopropanol a 80%, e colocada num novo microtubo. Pipetou-se directamente sobre o filtro da mini-coluna 50 µl de TE 1X (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) (ver Materiais, ponto 1), que deve estar a 65 °C no momento de utilização. Após 1 minuto a mini-coluna foi centrifugada em microcentrifuga (Biofuge Pico, Heraeus Instruments, Hanau, Germany), a 8000 rpm, durante 20 segundos. A mini-coluna foi retirada da microcentrifuga e o DNA purificado em TE 1X (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) foi armazenado a -20 °C.

12.5. Visualização dos amplicões após a purificação para sequenciação

Após a purificação, os amplicões foram submetidos a uma electroforese em gel de agarose (Gibco BRL™, Life Technologies, Grand Island, USA) a 1% em TAE 1X (ver Materiais, ponto 1) com 0,05 µl de brometo de etídeo por mililitro de agarose.

Foram colocados em cada poço 2 µl de amplicão purificado, 2 µl de tampão de arrastamento azul de Bromofenol (ver Materiais, ponto 1) e 4 µl de água bidestilada. Foi utilizado o marcador de massa molecular O'GeneRuler™, 100 bp DNA Ladder (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania) (ver Fig. 3) para confirmação da dimensão (pb) do amplicão. A electroforese decorreu durante 50 minutos a 100 V. A imagem do gel foi visualizada num transiluminador (BioRad, California, USA) e captada utilizando o programa "Quantity One" ("Software: Quantity One®").

Os amplicões purificados foram sequenciados (Macrogen®, Seoul, Korea) com os "primers" ou iniciadores específicos para sequenciação descritos nas Tabelas 16 e 17. Estes "primers" ou iniciadores são utilizados na sequenciação à concentração de 10 pmol/µl, diluídos em TE 1X (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8). Como resultado da sequenciação, obtêm-se as sequências que correspondem à amplificação dos sete genes de cada isolado.

12.6. Análise de sequências para determinação do perfil alélico

As sequências foram editadas utilizando o SeqMan, DNASTar® (DNASTAR, Inc., Madison, USA) e submetidas nas bases de dados pubmlst.org/suberis e pubmlst.org/sagalactiae. Aos alelos novos foram atribuídos novos números de alelo. O perfil alélico e sequência-tipo (ST) para cada isolado está disponível em pubmlst.org/suberis e para *S. agalactiae* os alelos tinham sido previamente descritos na base de dados (ST-2 ST-61) em pubmlst.org/sagalactiae (Ver Resultados).

RESULTADOS

1. Características dos isolados de *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *Streptococcus uberis*

Foram estudados no total 79 isolados de *Streptococcus*: *S. agalactiae* (n=32), *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (n=17) e *S. uberis* (n=30), recolhidos em 11 explorações leiteiras da região Ribatejo-Oeste, Portugal, sendo todos os isolados provenientes de mastites subclínicas de bovinos e definidos como estirpes de campo (Ver Métodos). Todos os isolados foram identificados no CIISA-FMV/UTL, Portugal.

No âmbito deste trabalho, todos os isolados foram repicados para placas de agar-sangue para avaliação da pureza das culturas, observação das características das colónias, nomeadamente quanto ao tipo de hemólise, para uma caracterização adicional dos isolados e para confirmação das espécies. Verificou-se que todos os isolados de *S. uberis* não apresentaram hemólise, como esperado (Facklam, 2002). Os isolados de *S. agalactiae* apresentavam β -hemólise, sendo em alguns isolados mais visível que noutros. Todos os isolados de *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* apresentaram α -hemólise. Os isolados de *S. agalactiae* foram testados pelo teste CAMP (ver Métodos). Todos deram resultados positivo, confirmando-se a sua identificação presumível como *Streptococcus* do Grupo B. Alguns isolados das três espécies foram testados para identificação de serótipos de Lancefield (com o sistema comercial Slidex® Strepto Kit) (Ver Métodos). Os isolados identificados previamente como *S. agalactiae* apresentaram resultado positivo com o anticorpo específico para grupo B (*Streptococcus* do Grupo B de Lancefield), os isolados *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* deram resultado positivo com o anticorpo específico para o grupo C (*Streptococcus* do Grupo C de Lancefield) e os isolados de *S. uberis* não aglutinaram com nenhum dos anticorpos específicos dos grupos incluídos no sistema comercial utilizado (A, B, C, D, F e G).

2. Teste de aglutinação para identificação de serótipos em *Streptococcus agalactiae*

Os 32 isolados de campo de *S. agalactiae*, recolhidos em seis explorações, foram testados por aglutinação (com o sistema comercial GBS Serotyping Kit) (Ver Métodos) para determinação de serótipos (Ver Tabela 18). O serótipo mais prevalente foi o II (28,13%), seguido dos serótipos V (18,75%), III (9,38%) e Ia (6,25%). Cerca de 1/3 dos isolados (37,5%) não foram tipados, por não aglutinarem com nenhum dos soros ou aglutinarem com todos. Na maioria dos casos, isolados da mesma exploração apresentaram o mesmo fenótipo. Os serótipos Ia, II, III e V foram observados em isolados das explorações L, C, A e J. Os isolados das explorações G e I são não tipáveis.

Tabela 18. Distribuição de serótipos dos isolados de *Streptococcus agalactiae* provenientes de seis explorações diferentes

Serótipo	Número de isolados (n=32)	Exploração de origem
Ia	2	J
II	3	J
	6	C
III	2	A
	1	C
V	6	L
Não tipáveis	12	G e I

3. Susceptibilidade a agentes antimicrobianos e fenótipos de resistência a macrólidos em *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *Streptococcus uberis*

Os 32 isolados de *S. agalactiae*, 17 isolados de *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e 30 isolados de *S. uberis* foram estudados, pelo método de difusão em disco (NCCLS, 2002), para avaliação da susceptibilidade aos seguintes agentes antimicrobianos: eritromicina (E, 15 µg), pirlimicina (PIR, 2 µg), tetraciclina (TET, 30 µg), vancomicina (VA, 30 µg) e cloranfenicol (C, 30 µg) (ver Métodos, Tabela 4).

A concentração mínima inibitória (MIC) foi determinada para o antibiótico vancomicina, pelo método de microdiluição (NCCLS, 2002) com o objectivo de confirmar o resultado de susceptibilidade reduzida pelo teste de difusão em disco, verificada em 23 isolados das três espécies (ver adiante).

Os fenótipos de resistência a macrólidos: resistência apenas a macrólidos (eritromicina) (fenótipo M); e resistência cruzada a macrólidos, lincosamidas (pirlimicina) e estreptogramina B (fenótipo MLS_B), foram determinados pelo método do duplo disco utilizando os discos dos antimicrobianos eritromicina-E (15 µg) e pirlimicina-PIR (2 µg) (adaptado de Seppälä *et al.*, 1993) (ver Métodos, Fig. 5).

Tabela 19. Percentagem de resistência aos antimicrobianos testados pelo método de difusão em disco, de acordo com as Normas “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS, 2002) em isolados de *Streptococcus* spp.

	E (%)	PIR (%)	TET (%)	VA (%) ^(a)	C (%)
<i>S. agalactiae</i>	21,9	21,9	65,6	34,4	0
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	23,5	35,3	100	58,8	0
<i>S. uberis</i>	23,3	53,3	60,0	6,7	0

E – eritromicina (15 µg); PIR – pirlimicina (2 µg); TET – tetraciclina (30 µg); VA – vancomicina (30 µg); C – cloranfenicol (30 µg) (NCCLS, 2002). (a) o resultado refere-se a susceptibilidade diminuída.

A percentagem de resistência à eritromicina foi elevada e comparável entre os isolados das três espécies (22%-23%), embora ligeiramente mais reduzida em *S. agalactiae* do que em *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *S. uberis* (ver Tabela 19).

A percentagem de resistência à pirlimicina foi mais elevada em isolados de *S. uberis* (53,3%) e em *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (35,3%), do que em isolados de *S. agalactiae* (21,9%).

A resistência à tetraciclina foi observada em mais de metade dos isolados de *S. agalactiae* e de *S. uberis* (60%-65%). Em *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* todos os isolados desta espécie eram resistentes a este antimicrobiano.

Foi detectada susceptibilidade diminuída à vancomicina (7%-34%) em 23 isolados das três espécies: 11 isolados de *S. agalactiae*, 10 de *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e dois de *S. uberis*, para os quais os halos de inibição de crescimento foram inferiores a 17 mm (diâmetro igual ou superior a 17 mm é interpretado como susceptibilidade diminuída. Ver Métodos, Tabela 5).

Todos os isolados eram uniformemente susceptíveis ao cloranfenicol.

Os valores da MIC para a vancomicina, nos 23 isolados, identificados por difusão em disco, com susceptibilidade reduzida, foi entre 0,5 e 1 µg/ml. Estes valores correspondem a valores de susceptibilidade a este antimicrobiano pelo método de microdiluição (NCCLS, 2002).

Em isolados das três espécies foi detectada resistência cruzada a macrólidos (eritromicina) e lincosamidas (pirlimicina) (fenótipo MLS_B). Observou-se ainda que a expressão deste fenótipo é constitutiva (cMLS_B) (ver Fig. 8). Nenhum isolado testado apresentou o fenótipo M. Em alguns isolados de todas as espécies foi detectada susceptibilidade à eritromicina e resistência à pirlimicina, sugerindo a presença do fenótipo de LSA, segundo Malbruny *et al.* (2004).

Os fenótipos de resistência a macrólidos encontrados nos isolados de *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *S. uberis* estão indicados na Tabela 20.

Tabela 20. Fenótipos de resistência a macrólidos em isolados de *Streptococcus* spp. identificados pelo teste do duplo-disco (adaptado de Seppälä *et al.*, 1993)

	Fenótipo	Nº isolados (%)
<i>S. agalactiae</i>	cMLS _B	7 (21,9)
	LSA	0
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	cMLS _B	4 (23,5)
	LSA	2 (11,8)
<i>S. uberis</i>	cMLS _B	7 (23,3)
	LSA	9 (30)

cMLS_B: fenótipo cMLS_B – resistência cruzada aos macrólidos (eritromicina – E) e lincosamidas (pirlimicina – PIR) de expressão constitutiva; LSA: fenótipo LSA: susceptibilidade aos macrólidos (eritromicina – E) e resistência às lincosamidas (pirlimicina – PIR). De acordo com as Normas “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS, 2002)



Figura 8. Placa de agar-sangue com isolado de fenótipo cMLS_B cMLS_B-resistência cruzada aos macrólidos (eritromicina – E) e lincosamidas (pirlimicina – PIR), de acordo com as Normas “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS, 2002), de expressão constitutiva: não há halo de inibição de crescimento bacteriano em torno do disco da eritromicina e da pirlimicina.

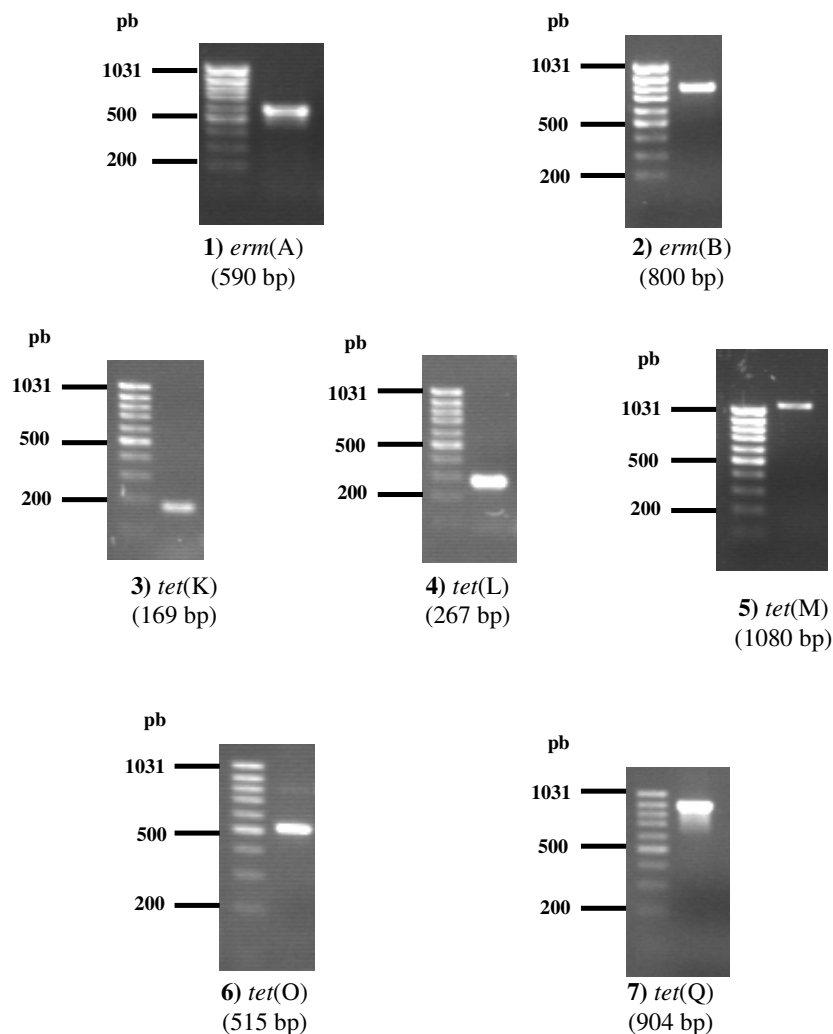
4. Genótipos de resistência a macrólidos e tetraciclina em *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *Streptococcus uberis*

Todos os isolados de fenótipo cMLS_B foram testados por PCR quanto à presença dos genes *erm*(A) e *erm*(B), que codificam para a metilase responsável pela resistência cruzada aos macrólidos e lincosamidas e do gene *mef*(A) que codifica para bombas de efluxo responsável pela resistência aos macrólidos e susceptibilidade a lincosamidas.

O gene *erm*(A) está geralmente associado ao fenótipo MLS_B de expressão indutível, i.e. resistência às lincosamidas induzida pelos macrólidos e o gene *erm*(B), geralmente associado ao fenótipo MLS_B de expressão constitutiva.

Todos os isolados para os quais se observou resistência à tetraciclina, pelo método de difusão em disco, foram testados por PCR quanto à presença de genes que codificam para proteínas de efluxo ou protecção do ribossoma, *tet*(K), *tet*(L), *tet*(M), *tet*(O), *tet*(Q), *tet*(S), *tet*(T) e *tet*(W), responsáveis pela resistência à tetraciclina.

Na Figura 9 estão incluídas imagens representativas de géis com os produtos de PCR obtidos por amplificação dos genes referidos.



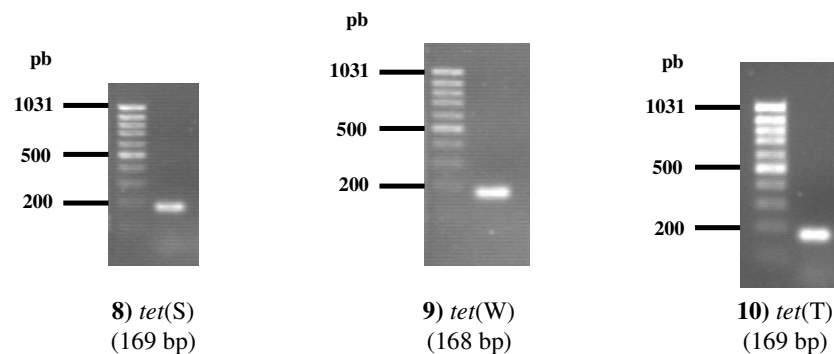


Figura 9. Imagens (da 1 à 10) representativas de géis com produtos de PCR obtidos por amplificação de sequências internas a genes de resistência aos macrólidos e tetraciclina. A primeira pista corresponde sempre ao marcador de massa molecular (O'GeneRuler™ 100 bp DNA ladder). A segunda pista corresponde ao produto de PCR amplificado em estirpes controlo (ver Métodos, Tabela 3). pb – pares de bases dos fragmentos.

Em todos os isolados cMLS_B foi detectado pelo menos um dos genes testados de resistência aos macrólidos. Em todos os isolados cMLS_B observou-se a presença do gene *erm*(B), excepto num isolado *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* que apresentou genótipo *erm*(A)⁺-*erm*(B)⁻. O gene *mef*(A) não foi detectado em nenhum isolado testado (ver Tabelas 21, 22 e 23).

Tabela 21. Fenótipos e genótipos de resistência a macrólidos e tetraciclina em *Streptococcus agalactiae*

Fenótipo de resistência	Nº de isolados (n=32)	Nº de isolados portadores dos vários genes de resistência detectados por PCR										
		<i>mef</i> (A)	<i>erm</i> (A)	<i>erm</i> (B)	<i>tet</i> (M)	<i>tet</i> (O)	<i>tet</i> (T)	<i>tet</i> (W)	<i>tet</i> (L)	<i>tet</i> (Q)	<i>tet</i> (K)	<i>tet</i> (S)
cMLS TET ^R	6	0	0	6	1	6	0	0	0	0	6	0
cMLS TET ^S	1	0	0	1	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
TET ^R	15	NT	NT	NT	6	15	0	0	0	0	15	0
Susceptíveis ^(a)	10	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

cMLS – fenótipo cMLS (resistência à eritromicina e pirlimicina) de expressão constitutiva; TET^S – susceptibilidade à tetraciclina; TET^R – resistência à tetraciclina. NT – não foi testado; ^(a) susceptíveis a todos os antimicrobianos testados.

Tabela 22. Fenótipos e genótipos de resistência a macrólidos e tetraciclina em *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*

Fenótipo de resistência	Nº de isolados (n=17)	Nº de isolados portadores dos vários genes de resistência detectados por PCR										
		<i>mef</i> (A)	<i>erm</i> (A)	<i>erm</i> (B)	<i>tet</i> (M)	<i>tet</i> (O)	<i>tet</i> (T)	<i>tet</i> (W)	<i>tet</i> (L)	<i>tet</i> (Q)	<i>tet</i> (K)	<i>tet</i> (S)
cMLS TET ^R	4	0	1	3	1	3	0	0	0	0	0	0
TET ^R	11	NT	NT	NT	3	1	0	0	0	0	0	1
LSA TET ^R	2	NT	NT	NT	1	1	0	0	0	0	0	0
Susceptíveis ^(a)	0	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

cMLS – fenótipo cMLS (resistência à eritromicina e pirlimicina) de expressão constitutiva; TET^R – resistência à tetraciclina; LSA – susceptibilidade à eritromicina e resistência à pirlimicina. NT – não foi testado; ^(a) susceptíveis a todos os antimicrobianos testados.

Tabela 23. Fenótipos e genótipos de resistência a macrólidos e tetraciclina em *Streptococcus uberis*

Fenótipo de resistência	Nº de isolados (n=30)	Nº de isolados portadores dos vários genes de resistência detectados por PCR										
		<i>mef(A)</i>	<i>erm(A)</i>	<i>erm(B)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>tet(O)</i>	<i>tet(T)</i>	<i>tet(W)</i>	<i>tet(L)</i>	<i>tet(Q)</i>	<i>tet(K)</i>	<i>tet(S)</i>
cMLS TET ^R	7	0	0	7	0	7	0	0	0	0	0	0
TET ^R	3	NT	NT	NT	2	0	0	0	0	0	0	1
LSA TET ^R	8	NT	NT	NT	1	1	0	0	0	0	0	7
LSA TET ^S	1	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Susceptíveis ^(a)	11	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

cMLS – fenótipo cMLS (resistência à eritromicina e pirlimicina) de expressão constitutiva; TET^S – susceptibilidade à tetraciclina; TET^R – resistência à tetraciclina; LSA – susceptibilidade à eritromicina e resistência à pirlimicina. NT – não foi testado; ^(a) susceptíveis a todos os antimicrobianos testados.

Em todos os isolados resistentes à tetraciclina foi detectado pelo menos um dos genes de resistência à tetraciclina testados, excepto em seis isolados *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, em que nenhum dos genes foi detectado.

Foram detectados os genes *tet(O)* em 61% do total de isolados resistentes à tetraciclina, *tet(K)* em 38%, *tet(M)* em 27%, e *tet(S)* em 16% (ver Tabelas 21, 22 e 23).

A associação entre os genes *erm(B)*, *tet(O)* e *tet(K)* foi observada em seis isolados de *S. agalactiae*. A associação entre os genes *tet(M)*, *tet(O)* e *tet(K)* foi observada em seis isolados de *S. agalactiae* e os genes *tet(O)* e *tet(K)* em nove isolados de *S. agalactiae* (ver Tabelas 21 e 24).

A associação entre os genes *erm(B)* e *tet(O)* foi observada em três isolados de *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (ver Tabelas 22 e 24) e em sete isolados de *S. uberis* (ver Tabelas 23 e 24). A associação de *erm(A)* e *tet(M)* foi detectada num isolado de *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (ver Tabelas 22 e 24).

A Tabela 24 sumariza os resultados obtidos da resistência a macrólidos e tetraciclina e respectivos fenótipos e genótipos nos isolados das três espécies de *Streptococcus*.

Tabela 24. Percentagens de resistência a macrólidos e tetraciclina e respectivos fenótipos e genótipos em *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *Streptococcus uberis*

Espécies (nº de isolados resistentes aos antimicrobianos/tot al de isolados)	Resistência aos macrólidos e tetraciclina (n=57/79)		Fenótipo de resistência aos antimicrobianos (E e TET)	Nº de isolados portadores dos vários genes de resistência detectados por PCR											
				Genes de resistência a macrólidos					Genes de resistência à tetraciclina						
	E (n=18)	TET (n=56)		<i>mef</i> (A)	<i>erm</i> (A)	<i>erm</i> (B)	<i>tet</i> (M)	<i>tet</i> (O)	<i>tet</i> (T)	<i>tet</i> (W)	<i>tet</i> (L)	<i>tet</i> (Q)	<i>tet</i> (K)	<i>tet</i> (S)	
<i>S. agalactiae</i> (n=22/32)	7 (32%)	21 (96%)	cMLS+TET ^R (n=6)	0	0	6	1	6	0	0	0	0	6	0	
			cMLS+TET ^S (n=1)	0	0	1	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			apenas TET ^R (n=15)	NT	NT	NT	6	15	0	0	0	0	15	0	
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> (n=17/17)	4 (24%)	17 (100%)	cMLS+TET ^R (n=4)	0	1	3	1	3	0	0	0	0	0	0	
			apenas TET ^R (n=13)	NT	NT	NT	4	2	0	0	0	0	0	1	
<i>S. uberis</i> (n=18/30)	7 (39%)	18 (100%)	cMLS+TET ^R (n=7)	0	0	7	0	7	0	0	0	0	0	0	
			apenas TET ^R (n=11)	NT	NT	NT	3	1	0	0	0	0	0	8	

E-eritromicina; TET- tetraciclina; cMLS – resistência cruzada aos macrólidos e lincosamidas de expressão constitutiva; cMLS TET^R – fenótipo cMLS e resistência à tetraciclina; cMLS TET^S – fenótipo cMLS_B e susceptibilidade à tetraciclina; apenas TET^R – resistência apenas à tetraciclina; NT - não foi testado.

5. Pesquisa de genes de virulência por PCR em *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*

Os 17 isolados *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* foram testados para detecção dos genes de virulência que codificam para as exotoxinas pirogênicas estreptocócicas A e C, SpeA e SpeC de *Streptococcus pyogenes* (Alouf & Müller-Alouf, 2003) e o gene que codifica para a toxina superantigênica estreptocócica SSA, também específica de *S. pyogenes* (Mollick *et al.*, 1993) (ver Figura 10).

Na Figura 10 estão incluídas imagens representativas de géis com os produtos de PCR obtidos por amplificação dos genes referidos.

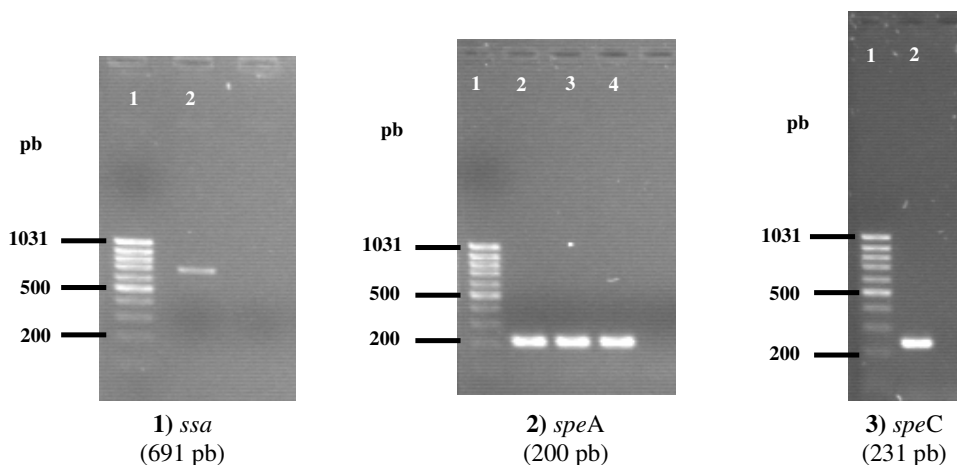


Figura 10. Imagens representativas de géis com produtos de PCR obtidos por amplificação de sequências internas a genes de virulência.

A pista 1 corresponde ao marcador de massa molecular (O'GeneRuler™ 100 bp DNA ladder). A pista 2, nas imagens 1) e 3) ou as pistas 2, 3 e 4, na imagem 2), correspondem aos produtos de PCR amplificados em estirpes controle (ver Métodos, Tabela 3). pb – pares de bases dos fragmentos.

Em nenhum dos isolados de *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* foram detectados os genes *speA* e *ssa*. Apenas o gene *speC* foi detectado em cinco isolados (29,4%).

6. Tipagem molecular por Electroforese em Gel de Agarose por Campo Pulsado (PFGE, de “Pulsed Field Gel Electrophoresis”)

Os 32 isolados de *S. agalactiae*, recolhidos em seis explorações (A, C, G, I, J, L), os 17 isolados de *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, recolhidos em oito explorações (B, C, D, E, F, G, I e J) e os 30 isolados de *S. uberis*, recolhidos em sete explorações (C, D, E, F, I, J e K) foram analisados por PFGE, utilizando a enzima *SmaI*, para definição do tipo clonal ou clone. Todos os isolados foram recolhidos de animais diferentes.

Os perfis electroforéticos variam entre 9 e 10 fragmentos em *S. agalactiae*, 10 e 15 em *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, e 9 e 16 em *S. uberis*, com massas moleculares compreendidas entre cerca de 10 a 485 kb.

Todos os perfis encontrados estão incluídos nas imagens das Figuras 11 a 13. O número atribuído a cada padrão de restrição está indicado nas imagens, em cima de cada perfil electroforético. Cada padrão de restrição, nas imagens, corresponde a isolados diferentes.

Todos os padrões de PFGE de isolados de cada uma das três espécies foram comparados entre si com o programa informático BioNumerics (ver Métodos).

- Perfis de PFGE de *S. agalactiae*

Os 32 isolados de *S. agalactiae*, recolhidos em seis explorações, foram agrupados em 20 padrões de restrição (ver Figura 11 e Tabela 25).

A semelhança entre os isolados foi baseada no dendrograma contruído com todos os padrões de restrição (Figura 16). Padrões com variação até seis bandas têm na maior parte dos casos 80% de semelhança e padrões até três bandas de diferença têm 95% de semelhança. Todos os isolados com padrões de restrição idênticos, com 100% de semelhança entre eles, são da mesma exploração e apresentam as mesmas características fenotípicas e genotípicas (Figura 16).

A relação genotípica dos isolados de cada exploração foi a seguinte:

Os sete isolados da exploração L são relacionados (*cluster* III). Seis isolados têm padrões de restrição com 100% de semelhança entre si (padrão 15) (*cluster* I) e 85% de semelhança com o padrão de outro isolado (padrão 16) (ver Figura 16).

Dos três isolados da exploração A, dois são relacionados (padrão 1) (*cluster* VI) e distintos (55% de semelhança) do terceiro isolado (padrão 2).

Os sete isolados da exploração J formam dois grupos clonais, não relacionados. Um grupo tem dois isolados com 100% de semelhança entre si (padrão 13) e com 95% de semelhança com o terceiro isolado (padrão 18) (*cluster* IX). O outro grupo tem dois isolados também com 100% de semelhança entre si (padrão 12) e 95% de semelhança com o terceiro isolado (padrão 14) (*cluster* XII). Os três isolados deste grupo têm 84% de semelhança com o sétimo isolado desta exploração (padrão 20) (*cluster* XIV).

Dos dez isolados da exploração C, sete formam dois grupos clonais, não relacionados. Um inclui quatro isolados com 100% de semelhança entre si (padrão 7) e 95% com um outro isolado (padrão 17) (*cluster* XI). O outro grupo inclui dois isolados com 100% de semelhança entre si (padrão 3). Os restantes três isolados não são relacionados entre si, nem com os outros isolados da mesma exploração.

Dos quatro isolados da exploração G, dois são relacionados (padrões 9 e 10 com 90% de semelhança entre si) (*cluster* V) e não são relacionados (76% de semelhança) com o terceiro isolado da mesma exploração (padrão 11) (*cluster* IV). Estes três isolados não são relacionados (59% de semelhança) com o quarto isolado da mesma exploração (padrão 8) (*cluster* VII).

O único isolado de *S. agalactiae* da exploração I é distinto de todos os outros (55% semelhança; padrão 19) (*cluster* VIII).

Alguns isolados da mesma exploração, considerados a mesma estirpe (100% de semelhança) foram recolhidos em diferentes dias.

Foram ainda identificados três grupos de isolados relacionadas (com mais de 80% de semelhança) e provenientes de explorações distintas. Um dos grupos inclui seis isolados da exploração L (padrão 15), um isolado da exploração G (padrão 11) e um isolado da exploração C (padrão 6) com cerca de 90% de semelhança (*cluster* II). Outro *cluster* agrupa três isolados da exploração J (padrões 13 e 18) e cinco isolados da exploração C (padrões 7 e 17), com 83% de semelhança (*cluster* X). Ainda outro *cluster* agrupa três

isolados da exploração J (padrões 12 e 14) e dois isolado da exploração C (padrão 3), com 91% de semelhança (*cluster XIII*) (ver Figura 16).

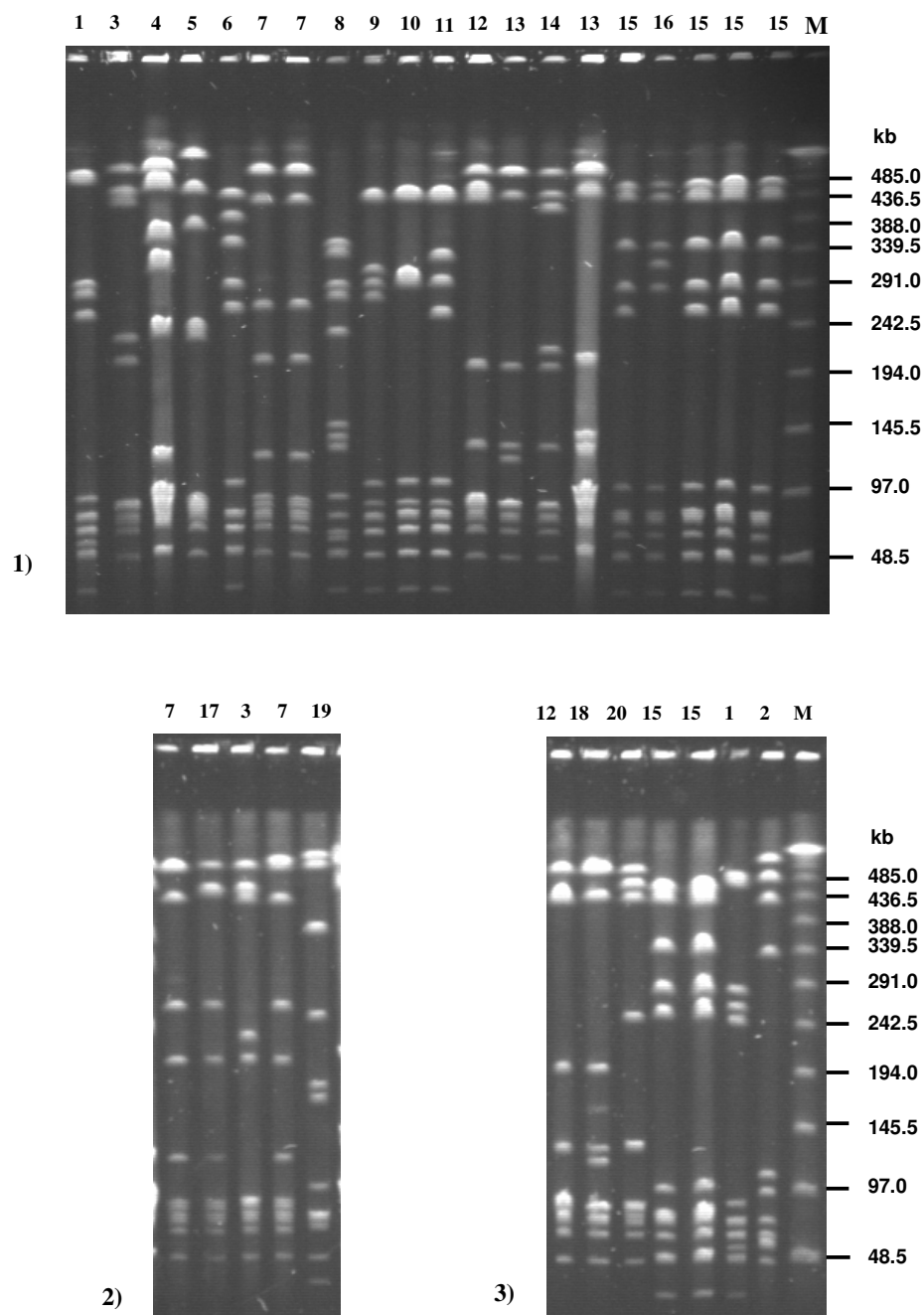


Figura 11. Imagem dos padrões de restrição de *Streptococcus agalactiae* gerados por PFGE utilizando a enzima *Sma*I.

As pistas identificadas com M correspondem ao marcador de massa molecular utilizado (Lambda ladder PFG marker). Todas as outras pistas correspondem a padrões de restrição dos diferentes isolados *S. agalactiae*. kb – kilobases.

Tabela 25. Distribuição de padrões de restrição gerados por PFGE utilizando a enzima *SmaI* dos isolados *S. agalactiae*.

Nº de isolados <i>S. agalactiae</i> em cada padrão (n=32)	Padrão <i>SmaI</i>	Código da exploração onde foram recolhidas as estirpes de campo
2	1	A
1	2	A
2	3	C
1	4	C
1	5	C
1	6	C
4	7	C
1	8	G
1	9	G
1	10	G
1	11	G
2	12	J
2	13	J
1	14	J
6	15	L
1	16	L
1	17	C
1	18	J
1	19	I
1	20	J

- Perfis de PFGE de *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*

Os 17 isolados de *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, recolhidos em oito explorações, foram agrupados em 14 padrões de restrição *SmaI* gerados por PFGE (Tabela 26).

A semelhança entre os isolados foi baseada no dendrograma contruído com todos os padrões de restrição (Fig. 17), excepto com o de um isolado cujo DNA não foi cortado com *SmaI* (padrão UR, Fig. 12). O DNA deste isolado foi cortado com a enzima *SfiI* mas não foi comparado com os perfis de restrição gerados pela *SmaI*.

Padrões com variação até seis bandas têm, no geral, 80% de semelhança e padrões com três bandas de diferença têm 95% de semelhança.

Tal como observado em *S. agalactiae*, foram identificados alguns isolados relacionados (com mais de 80% de semelhança) mas o número e composição dos grupos de isolados foi menor e, na maioria dos casos, os isolados relacionados eram provenientes de explorações diferentes.

De facto, um dos grupos é formado por três isolados; um da exploração F (padrão 27) e um da exploração B (padrão 22) com 93% de semelhança entre si, que partilham 81% de semelhança com um terceiro isolado também da exploração F (padrão 29) (*cluster I*) (ver Figura 17). Um outro grupo tem três isolados; dois isolados da exploração G com 100% de semelhança entre eles (padrão 32) e outro da exploração F (padrão 31) com 83% de semelhança com os anteriores (*cluster II*). Um terceiro grupo contém também três isolados; um da exploração I e outro da exploração J com 100% de semelhança entre si (padrão 34), que partilham 80% de semelhança com um outro isolado da exploração B (padrão 21) (*cluster IV*).

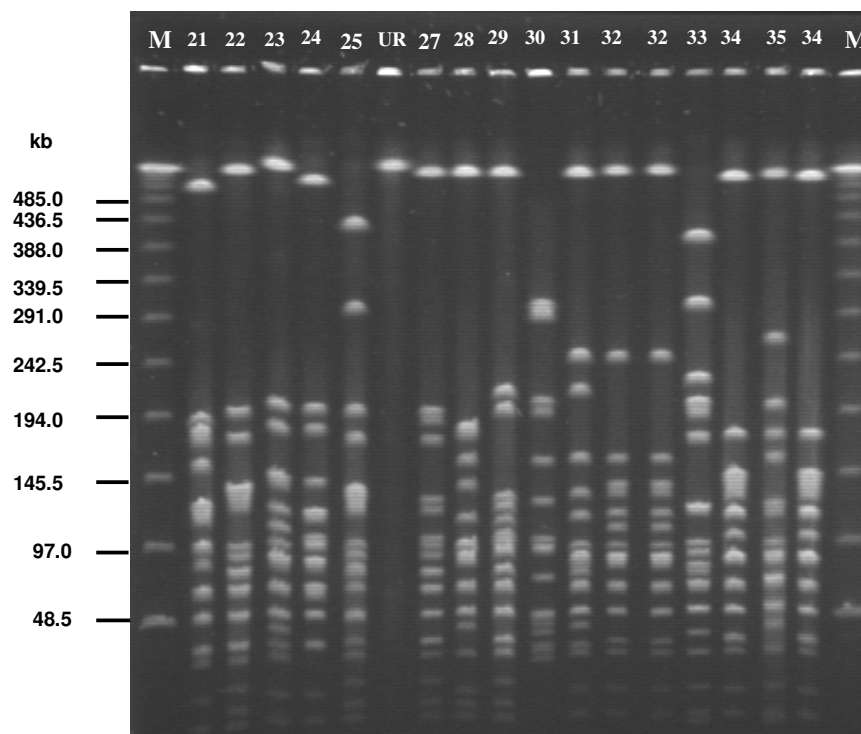


Figura 12. Imagem dos padrões de restrição de *Sreptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* gerados por PFGE utilizando a enzima *Sma*I.

As pistas identificadas com M correspondem ao marcador de massa molecular utilizado (Lambda ladder PFG marker). Todas as outras pistas correspondem a padrões de restrição dos diferentes isolados *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*. O padrão designado de UR representa o isolado não cortado pela *Sma*I. kb – kilobases.

Tabela 26. Distribuição de padrões de restrição gerados por PFGE utilizando a enzima *Sma*I dos isolados *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*.

Nº de isolados <i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> em cada padrão (n=17)	Padrão <i>Sma</i> I	Código da exploração onde foram recolhidas as estirpes de campo
1	21	B
1	22	B
1	23	C
1	24	D
1	25	E
1	UR	E
1	27	F
1	28	F
1	29	F
1	30	F
1	31	F
2	32	G
1	33	G
2	34	I e J
1	35	J

UR – “unrestricted pattern” (perfil não cortado utilizando a enzima *Sma*I).

Outro dos grupo contem dois isolados; um da exploração D e outro da exploração C com 87% de semelhança entre si (*cluster* III) (ver Figura 17). Os restantes cinco isolados *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* deste estudo não foram considerados relacionados (menos de 80% de semelhança) (ver Figura 17).

- Perfis de PFGE de *S. uberis*

Os 30 isolados de *S. uberis*, recolhidos em sete explorações, apresentam 29 padrões de restrição distintos (Tabela 27).

A semelhança entre os isolados foi baseada no dendrograma contruído com todos os padrões de restrição (Figura 18). Padrões de restrição que apresentam até três bandas de diferença entre eles têm 90-95% de semelhança e padrões até seis bandas de diferença têm na maioria dos casos 80% de semelhança.

Os 17 isolados da exploração F foram incluídos em três grupos. Um desses grupos contem dois isolados que foram recolhidos em períodos diferentes (Março de 2002 e Julho de 2002) e que partilham 100% de semelhança entre eles (padrão 49). Estes dois isolados estão relacionados com outro isolado (padrão 54) a 93% de semelhança (*cluster* V). O segundo grupo contem dois isolados (padrões 53 e 59) com 97% de semelhança entre eles, e que partilham 94% de semelhança com um terceiro isolado (padrão 52). Ainda outro isolado da exploração F (padrão 48) partilha 80% de semelhança com estes três isolados anteriores (*cluster* IV). Outro grupo constituído por isolados da exploração F contem dois isolados (padrões 50 e 57) que partilham 83% de semelhança entre eles (*cluster* III). Os restantes oito isolados da exploração F não são considerados relacionados (menos que 80% de semelhança) (ver Figura 18).

Os seis isolados da exploração I foram incluídos em dois grupos que não são relacionados (menos de 80% de semelhança) (*clusters* II e I). Um grupo é constituído por dois isolados com padrões relacionados (padrões 42 e 43) a 93% de semelhança entre si (*cluster* II), o qual é relacionado (a 83% de semelhança) com outros isolados da exploração F (padrões 50 e 57). O outro grupo contem dois isolados da exploração I que partilham 93% de semelhança entre eles (padrões 39 e 40), e que partilham 86% de semelhança com um terceiro isolado da mesma exploração (padrão 41) (*cluster* I). O restante isolado da exploração I não é relacionado com nenhum dos anteriores isolados da mesma exploração (menos que 80% de semelhança).

Os três isolados da exploração K e os quatro isolados das explorações C, D, E e J não são relacionados (ver Figura 18).

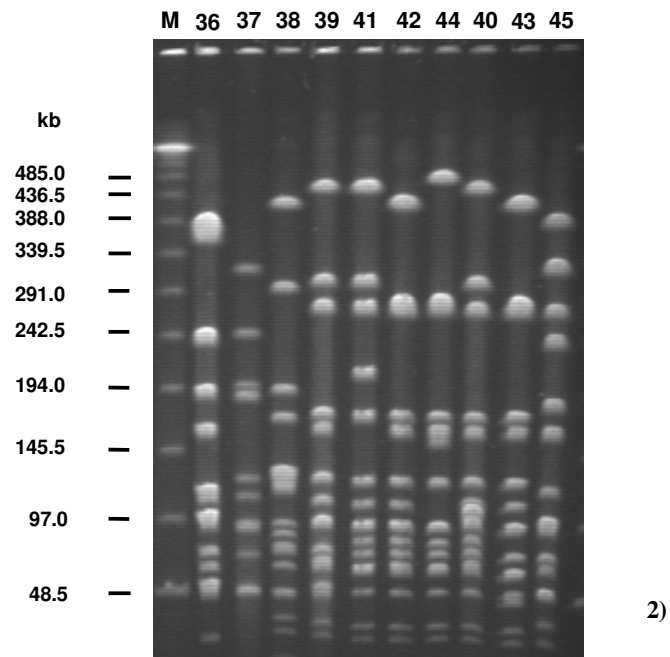
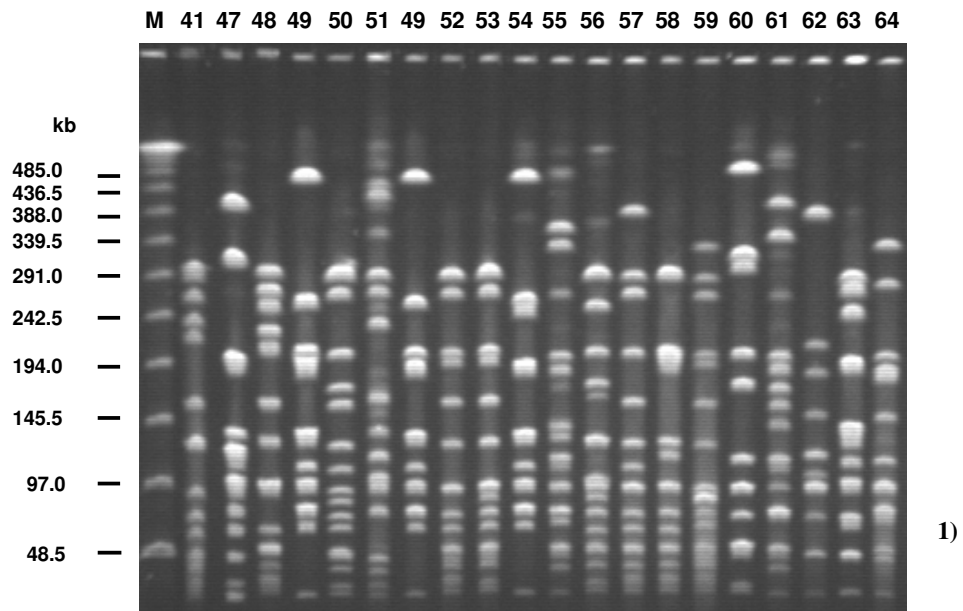


Figura 13. Imagem dos padrões de restrição de *Streptococcus uberis* gerados por PFGE utilizando a enzima *Sma*I.
A primeira e última pistas correspondem ao marcador de massa molecular utilizado (Lambda ladder PFG marker). As restantes pistas correspondem a padrões de restrição dos diferentes isolados *S. uberis*. kb – kilobases.

Tabela 27. Distribuição de padrões de restrição gerados por PFGE utilizando a enzima *SmaI* dos isolados *S. uberis*.

Nº de isolados <i>S. uberis</i> em cada padrão (n=30)	Padrão <i>SmaI</i>	Código da exploração onde foram recolhidas as estirpes de campo
1	36	C
1	37	D
1	38	E
1	39	I
1	40	I
1	41	I
1	42	I
1	43	I
1	44	I
1	45	J
1	46	F
1	47	F
1	48	F
2	49	F
1	50	F
1	51	F
1	52	F
1	53	F
1	54	F
1	55	F
1	56	F
1	57	F
1	58	F
1	59	F
1	60	F
1	61	F
1	62	F
1	63	K
1	64	K

7. Multilocus Sequence Typing - MLST em *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus uberis*

Foram seleccionados nove isolados dos 30 isolados de *S. uberis* e seis isolados dos 32 isolados de *S. agalactiae* para análise por MLST.

O critério para selecção destes isolados foi o seguinte: para *S. uberis* os isolados foram escolhidos tendo como base os resultados obtidos por PFGE. A partir do dendrograma com todos os padrões de restrição *Sma*I de *S. uberis* foram seleccionados isolados representativos, que partilham semelhanças de 90%, 80%, 70%, 60% e 50% entre eles. Para *S. agalactiae* foram também escolhidos isolados tendo como base os resultados obtidos por PFGE. A partir do dendrograma com todos os padrões de restrição *Sma*I de *S. agalactiae*, foram escolhidos isolados representativos que partilham semelhanças de 55%, 70%, 75% e 85%. Dois dos isolados (VSA4 e VSA10) foram escolhidos porque partilham mais de 80% de semelhança com outros dois isolados *S. agalactiae* de origem humana (ver Fig. 20).

Os seis isolados *S. agalactiae* analisados por MLST são VSA2, VSA4, VSA6, VSA10, VSA16 e VSA22 (das explorações L, C e A) (ver Tabela 28).

Os nove isolados de *S. uberis* analisados por MLST são VSU6, VSU8, VSU10, VSU13, VSU15, VSU19, VSU21, VSU23 e VSU30 (das explorações F, I e C) (ver Tabela 29).

Nas Figuras 14 e 15 estão indicados os produtos de amplificação por PCR dos sete genes *housekeeping* de *S. agalactiae* (<http://sagalactiae.mlst.net/>) e *S. uberis* (<http://pubmlst.org/suberis/>) separados em electroforese em gel de agarose.

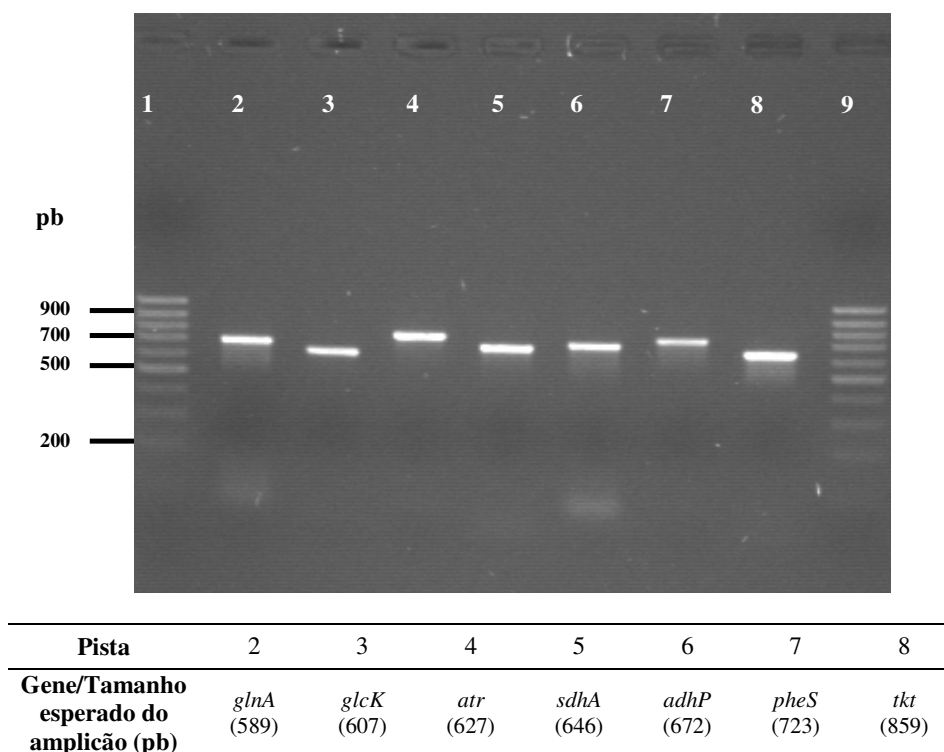


Figura 14. Produtos de amplificação por PCR dos sete genes *housekeeping* de *Streptococcus agalactiae* para MLST (<http://sagalactiae.mlst.net/>).

Pistas 1 e 9 correspondem ao marcador de massa molecular utilizado (O'GeneRuler™ 100 bp DNA ladder). Pista 2 a 8 são amostras de produtos de PCR, obtidos neste estudo, para cada um dos genes amplificados, num dos isolados deste estudo (ver tabela a seguir à imagem), pb – pares de bases dos fragmentos.

Foram obtidos, em três dos sete genes *housekeeping* de *S. agalactiae*, produtos de amplificação que não correspondem ao tamanho de amplificação esperado (ver Figura 14; genes *glnA*, *atr*, *tkl*) conforme descrito em <http://sagalactiae.mlst.net/> e por Jones *et al.* (2003). No entanto, após sequenciação foi possível editar as sequências destes alelos, juntamente com as restantes de tamanho esperado, as quais foram depois submetidas na base de dados (em <http://sagalactiae.mlst.net/>) tendo sido determinado o perfil alélico de todos os isolado *S. agalactiae* estudados utilizando esta técnica (ver Tabela 28).

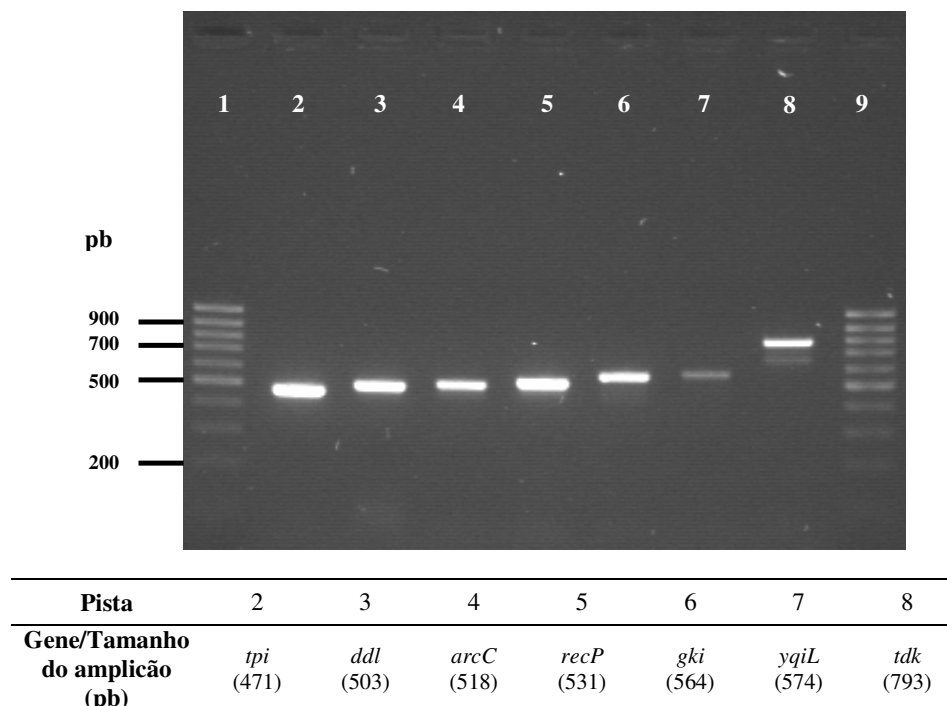


Figura 15. Produtos de amplificação por PCR dos sete genes *housekeeping* de *Streptococcus uberis* para MLST (<http://pubmlst.org/suberis/>).

Pistas 1 e 9 correspondem ao marcador de massa molecular utilizado (O'GeneRuler™ 100 bp DNA ladder). Pistas 2 a 8 são amostras de produtos de PCR, de dimensão esperada, de cada um dos genes amplificados, num dos isolados deste estudo (ver tabela a seguir à imagem), pb – pares de bases dos fragmentos.

Tabela 28. Perfil alélico dos isolados de *Streptococcus agalactiae* testados por *multilocus sequence typing* (MLST), de acordo com <http://sagalactiae.mlst.net/>

Isolados de <i>S. agalactiae</i> testados por MLST	Genes/Alelos							ST
	<i>adhP</i>	<i>pheS</i>	<i>atr</i>	<i>glnA</i>	<i>sdhA</i>	<i>glcK</i>	<i>tkl</i>	
VSA2	1	1	3	1	1	2	2	2
VSA4	1	1	3	1	1	2	2	2
VSA6	13	1	1	13	1	1	1	61
VSA10	1	1	3	1	1	2	2	2
VSA16	13	1	1	13	1	1	1	61
VSA22	13	1	1	13	1	1	1	61

VSA – código da espécie *Streptococcus agalactiae* (seguida do número a que corresponde o isolado);
ST – Tipo de sequência (“sequence type”)

Os seis isolados de *S. agalactiae* são de dois ST (ST-2 e ST-61) (ver Tabela 28). Nenhum dos ST ou alelos é novo (<http://sagalactiae.mlst.net/>).

De acordo com a base de dados pública (<http://sagalactiae.mlst.net/>), ST-2 (dos isolados VSA2, VSA4 e VSA10) apresenta variação num *locus* (SLV, *single-locus variation*) em relação a ST-1, previamente atribuído a três isolados de *S. agalactiae* de origem humana, recolhidos no Reino Unido.

O ST-61 (dos isolados VSA16, VSA22 e VSA6) apresenta variação em dois *loci* (DLV, *double-locus variation*) em relação a ST-17 e ST-18, previamente atribuídos a 14 isolados de *S. agalactiae* também de origem humana, recolhidos no Reino Unido.

Os nove isolados de *S. uberis* são de seis ST diferentes, encontrados pela primeira vez neste estudo (Rato *et al.*, 2006; artigo submetido para publicação) (ver Tabela 29). Os novos ST, atribuídos pelo gestor da base de dados pública (pubmlst.org/suberis/) são: ST-265, ST-266, ST-267, ST-268, ST-269, ST-270 (ver Tabela 29).

Um dos novos ST (ST-267), dos isolados VSU10, VSU21, VSU23 e VSU30, resultou de uma combinação diferente de alelos, anteriormente descritos na base de dados *S. uberis* (pubmlst.org/suberis/). Nos restantes ST novos (ST-265, ST-266, ST-268, ST-269, ST-270) foram encontrados novos alelos em um ou dois dos sete *loci* (ver Tabela 29).

Apenas um ST (ST-269) foi identificado como pertencente a um complexo clonal (ST-143) o qual inclui 116 isolados de Nova Zelândia, Austrália e Reino Unido, dos quais os isolados da Nova Zelândia são predominantes.

Tabela 29. Perfil alélico e complexo clonal dos isolados de *Streptococcus uberis* testados *multilocus sequence typing* (MLST), de acordo com <http://pubmlst.org/suberis/>.

Isolados <i>S. uberis</i> testados por MLST	Genes/Alelos							ST	Complexo clonal (ST)
	<i>arcC</i>	<i>ddl</i>	<i>gki</i>	<i>recP</i>	<i>tdk</i>	<i>tpi</i>	<i>yqiL</i>		
VSU6	4	1	26	3	2	2	5	265	143
VSU8	2	10	2	1	38	4	27	266	
VSU10	9	1	5	3	17	4	10	267	
VSU13	9	1	27	2	39	1	17	268	
VSU15	38	1	2	2	29	4	3	269	
VSU19	6	1	5	14	17	1	3	270	
VSU21	9	1	5	3	17	4	10	267	
VSU23	9	1	5	3	17	4	10	267	
VSU30	9	1	5	3	17	4	10	267	

VSU – código da espécie *Streptococcus uberis* (seguida do número a que corresponde o isolado); ST – Tipo de sequência (“sequence type”); alelos novos e perfis alelos novos ou ST novos estão representados a negrito. O complexo clonal foi atribuído pelo gestor da base de dados de MLST de *S. uberis* em <http://pubmlst.org/suberis/>.

8. Dendrogramas e associação entre *clone*, fenótipos e genótipos de *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *S. uberis* isolados de bovinos.

Como referido anteriormente, a semelhança entre os isolados das três espécies foi baseada em dendrogramas contruídos com todos os padrões de restrição produzidos com a enzima *Sma*I (Figuras 16-18).

Observou-se uma maior homologia entre padrões de restrição nos isolados *S. agalactiae* (20 padrões em 32 isolados) do que em *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (14 padrões em 17 isolados) ou *S. uberis* (29 padrões em 30 isolados). Considerando como índice de clonalidade a proporção entre o número de padrões de PFGE encontrados e o número de isolados estudados, confirmamos que os isolados de *S. agalactiae* são mais clonal e os isolados de *S. uberis* são mais heterogêneos ou policlonais.

Observando o dendrograma de *S. agalactiae*, verifica-se que pode ser dividido em dois *ramos* (unidos com 55% de semelhança). Dentro de cada um destes dois *ramos* (*cluster* VII e XV) verifica-se que todos os isolados testados por MLST apresentam ST iguais (ST-2) ou (ST-61) (Fig. 16). O conjunto de isolados ST-2 são, a maioria, multiresistentes - resistentes a macrólidos, lincosamidas e tetraciclina (fenótipo cMLS_B e Tet), com genótipo *erm*(B) ou *tet*(M) associado a *tet*(O) e *tet*(K), enquanto que o conjunto de isolados ST-61 são ou susceptíveis ou resistentes à tetraciclina mas com genótipo diferente, *tet*(O) e *tet*(K).

Observando o dendrograma de *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (Fig. 17), verifica-se que pode ser também dividido em dois *ramos* (unidos com menos de 65% de semelhança). No entanto, dentro de cada um dos *ramos* os isolados têm fenótipos e genótipos de resistência a antimicrobianos muito distintos.

Observando o dendrograma de *S. uberis* (Fig. 18), consideramos quatro *ramos* (dois a cerca de 66% de semelhança entre eles (*cluster* VI) , unidos aos dois restantes com aproximadamente 56% de semelhança) (*cluster* VII), mas isolados com idênticos fenótipos e genótipos são posicionados em *ramos* distintos.

No dendrograma representativo de todos os padrões de PFGE diferentes encontrados em todos os isolados de *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *S. uberis*, (Figura 19) observa-se uma grande heterogeneidade de padrões com diferentes níveis de semelhança.

A divisão das espécies foi mais nítida para GBS. Dos 20 padrões de GBS incluídos no dendrograma, apenas um padrão não foi agrupado com os restantes padrões de isolados da mesma espécie. Dos 29 padrões de *S. uberis*, um padrão foi incluído no grupo dos 19 padrões GBS e outros sete padrões foram posicionados num grupo que contem maioritariamente padrões de isolados GCS. Dos 15 padrões de GCS, um padrão foi colocado num grupo com maioritariamente padrões de isolados de *S. uberis*.

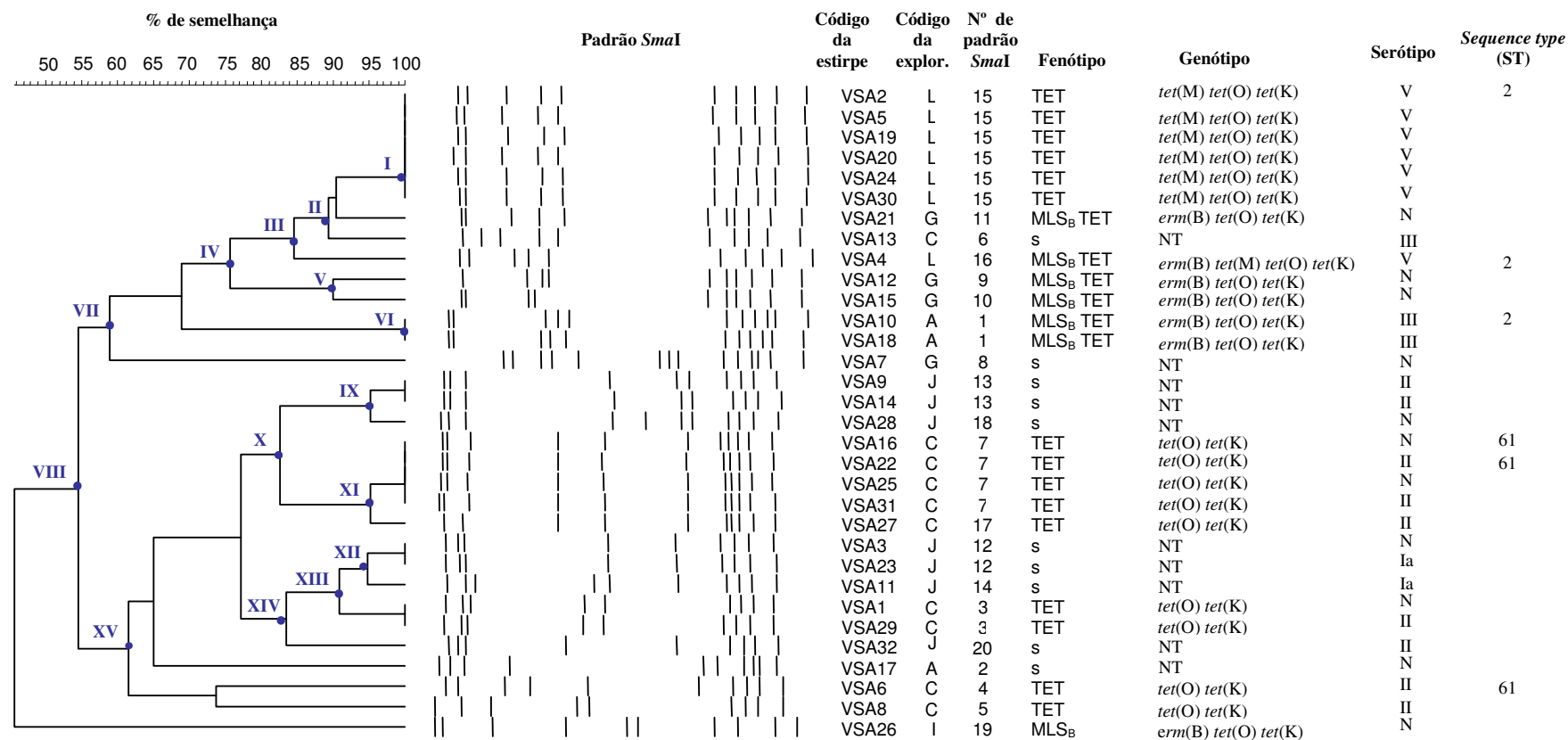


Figura 16. Dendrograma construído com todos os padrões de restrição com *SmaI* gerados por PFGE em *Streptococcus agalactiae*

Para cada um dos 32 isolados está indicado o código da exploração, o padrão de restrição com *SmaI*, fenótipo e genótipo de resistência, serótipo e ST (*sequence type*, perfil alélico obtido por sequencição de múltiplos *loci* (MLST)). NT – Não foi testado; N – serótipo não identificado, não tipadas; S – susceptível aos antimicrobianos testados; TET – resistência à tetraciclina; MLS_B – resistência cruzada aos macrólidos e lincosamidas; MLS_B TET – fenótipo MLS_B e resistência à tetraciclina. As condições para a elaboração do dendrograma foram as seguintes: Dice (Tol 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%] – O coeficiente de semelhança utilizado foi o “Dice” e o método de agrupamento foi o “UPGMA” (*Unweighted pair group method with arithmetic averages*). Foi utilizado uma otimização de 0,00% (representando a distância relativa que um perfil se pode mover em comprimento para se ajustar) e uma tolerância entre a posição de bandas dos diferentes perfis de restrição de 1,5%.

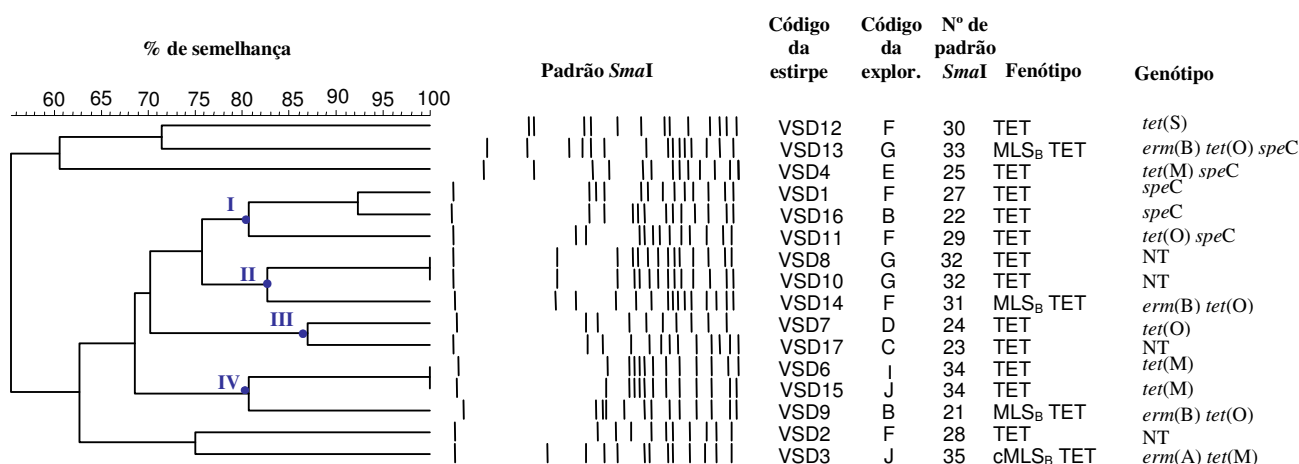


Figura 17. Dendrograma construído com todos os padrões de restrição com *SmaI* gerados por PFGE em *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*.

Para cada um dos 17 isolados está indicado o código da estirpe e da exploração, o padrão de restrição com *SmaI*, fenótipo e genótipo de resistência. NT – Não foi testado; TET – resistência à tetraciclina; MLS_B – resistência cruzada aos macrolídeos e lincosamidas; MLS_B TET – fenótipo MLS_B e resistência à tetraciclina. As condições para a elaboração do dendrograma foram as seguintes: Dice (Tol 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%] - O coeficiente de semelhança utilizado foi o "Dice" e o método de agrupamento foi o "UPGMA" (*Unweighed pair group method with arithmetic averages*). Foi utilizado uma otimização de 0,00% (representando a distância relativa que um perfil se pode mover em comprimento para se ajustar) e uma tolerância entre a posição de bandas dos diferentes perfis de restrição de 1,5%.

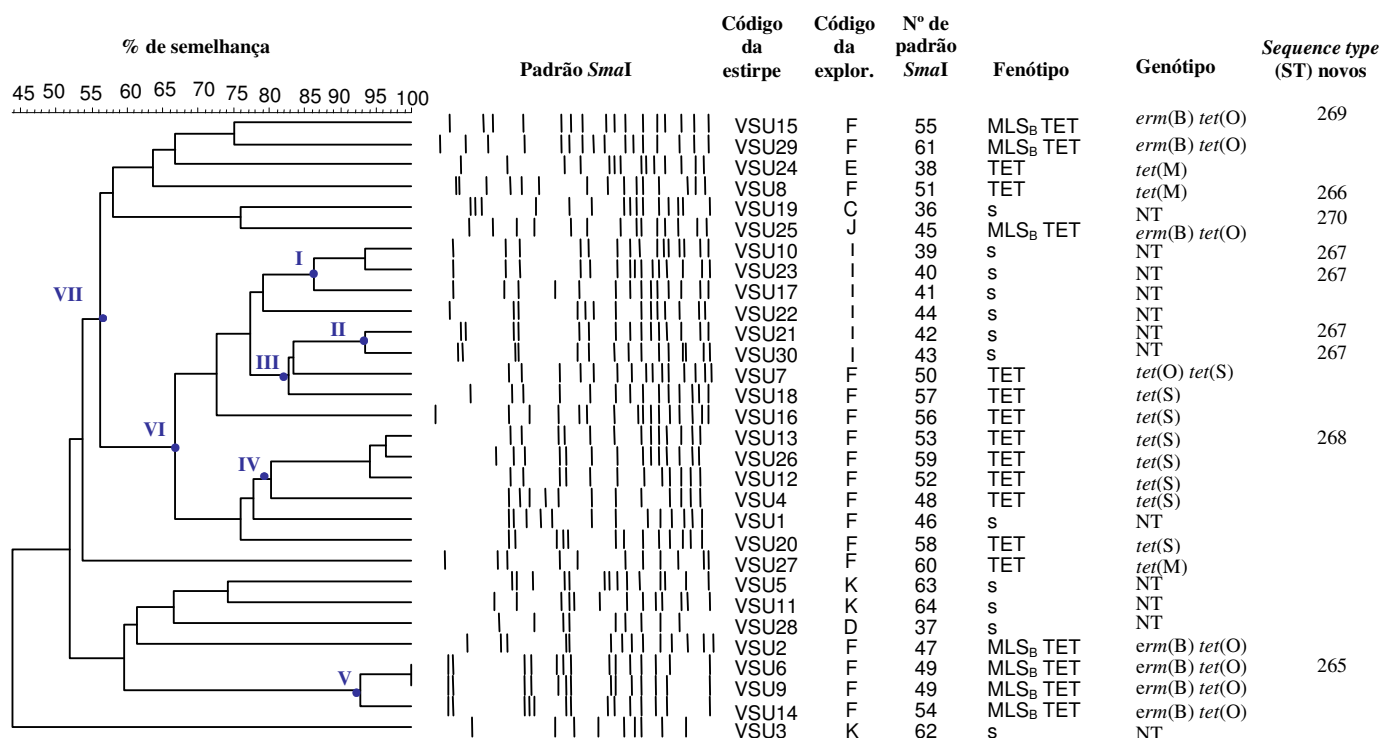


Figura 18. Dendrograma construído com os padrões gerados por PFGE usando a enzima *SmaI* nos 30 isolados *Streptococcus uberis*.

Para cada um dos 30 isolados está indicado o código da exploração, o padrão de restrição com *SmaI*, fenótipo e genótipo de resistência e ST (*sequence type*, perfil alélico obtido por sequenciação de múltiplos loci (MLST)). NT – Não foi testado; S – susceptível aos antimicrobianos testados; TET – resistência à tetraciclina; MLS_B – resistência cruzada aos macrolídeos e lincosamidas; MLS_B TET – fenótipo MLS_B e resistência à tetraciclina. As condições para a elaboração do dendrograma foram as seguintes: Dice (Tol 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%] – O coeficiente de semelhança utilizado foi o "Dice" e o método de agrupamento foi o "UPGMA" (*Unweighed pair group method with arithmetic averages*). Foi utilizado uma otimização de 0,00% (representando a distância relativa que um perfil se pode mover em comprimento para se ajustar) e uma tolerância entre a posição de bandas dos diferentes perfis de restrição de 1,5%.

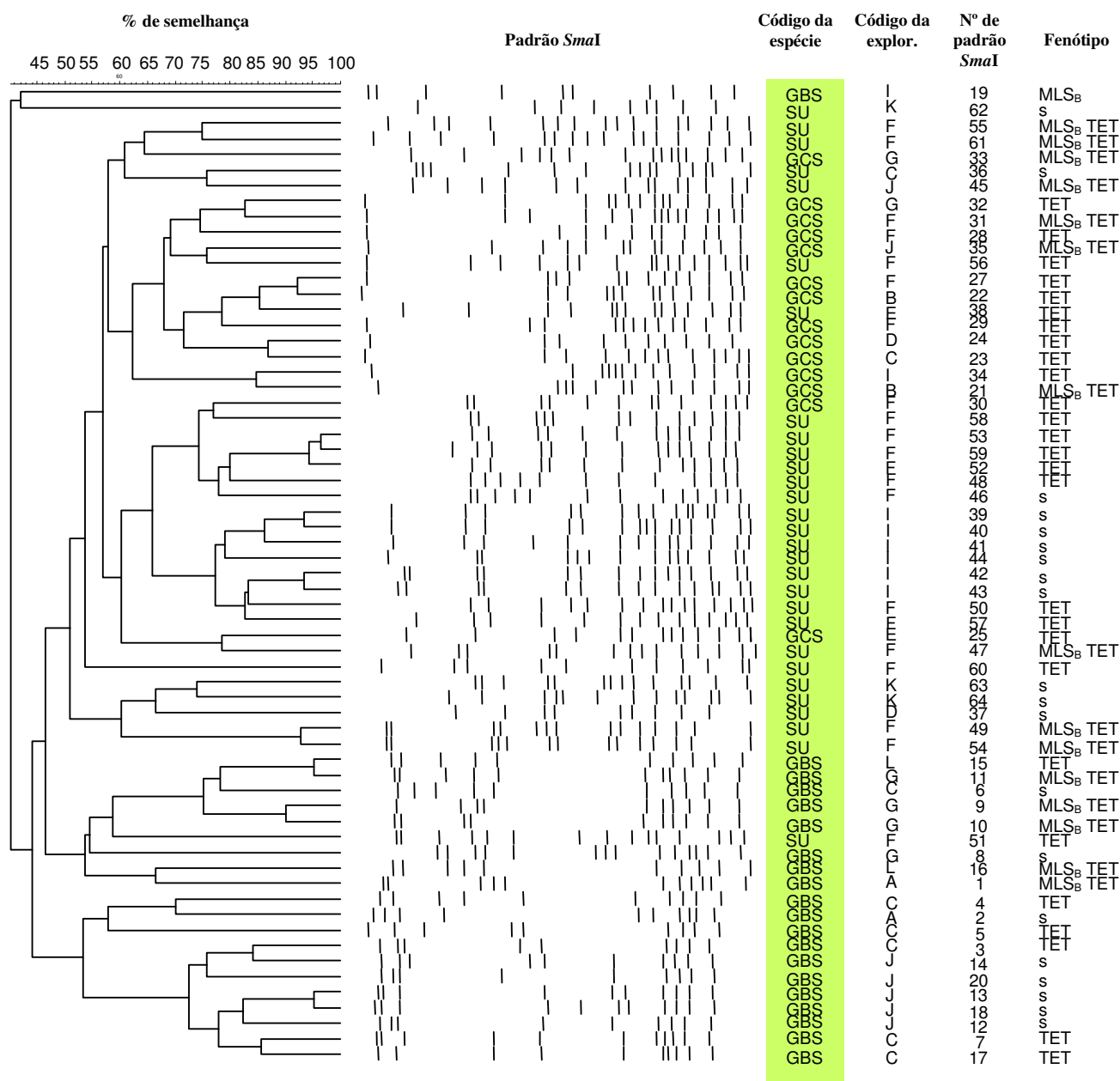


Figura 19. Dendrograma representativo de todos os padrões diferentes de restrição com *SmaI* gerados por PFGE identificados em todos os isolados de *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *S. uberis*.

Está indicado para cada isolado de cada espécie, o código da exploração, o padrão de restrição com *SmaI* e fenótipo.

GBS – isolados de *Streptococcus agalactiae*; GCS – isolados de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*; SU – isolados de *Streptococcus uberis*. TET – resistência à tetraciclina; MLS_B – fenótipo cMLS_B (resistência aos macrólidos (eritromicina) e lincosamidas (pirlomicina); MLS_B TET – fenótipo MLS_B e resistência à tetraciclina; s – susceptível aos antimicrobianos testados. As condições para a elaboração do dendrograma foram as seguintes: Dice (Tol 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%] – O coeficiente de semelhança utilizado foi o “Dice” e o método de agrupamento foi o “UPGMA” (Unweighed pair group method with arithmetic averages). Foi utilizado uma otimização de 0,00% (representando a distância relativa que um perfil se pode mover em comprimento para se ajustar) e uma tolerância entre a posição de bandas dos diferentes perfis de restrição de 1,5%.

9. Dendrograma de perfis electroforéticos de isolados *Streptococcus agalactiae* de origem bovina e *Streptococcus agalactiae* de origem humana

Os 20 isolados representativos de *S. agalactiae* (com padrões de PFGE diferentes) provenientes das várias explorações bovinas foram comparados com 73 isolados de *S. agalactiae* de origem humana, provenientes de colheitas efectuadas em mulheres grávidas em Hospitais e estudados por outros investigadores (Nogueira *et al.*, resultados não publicados (Ver Métodos).

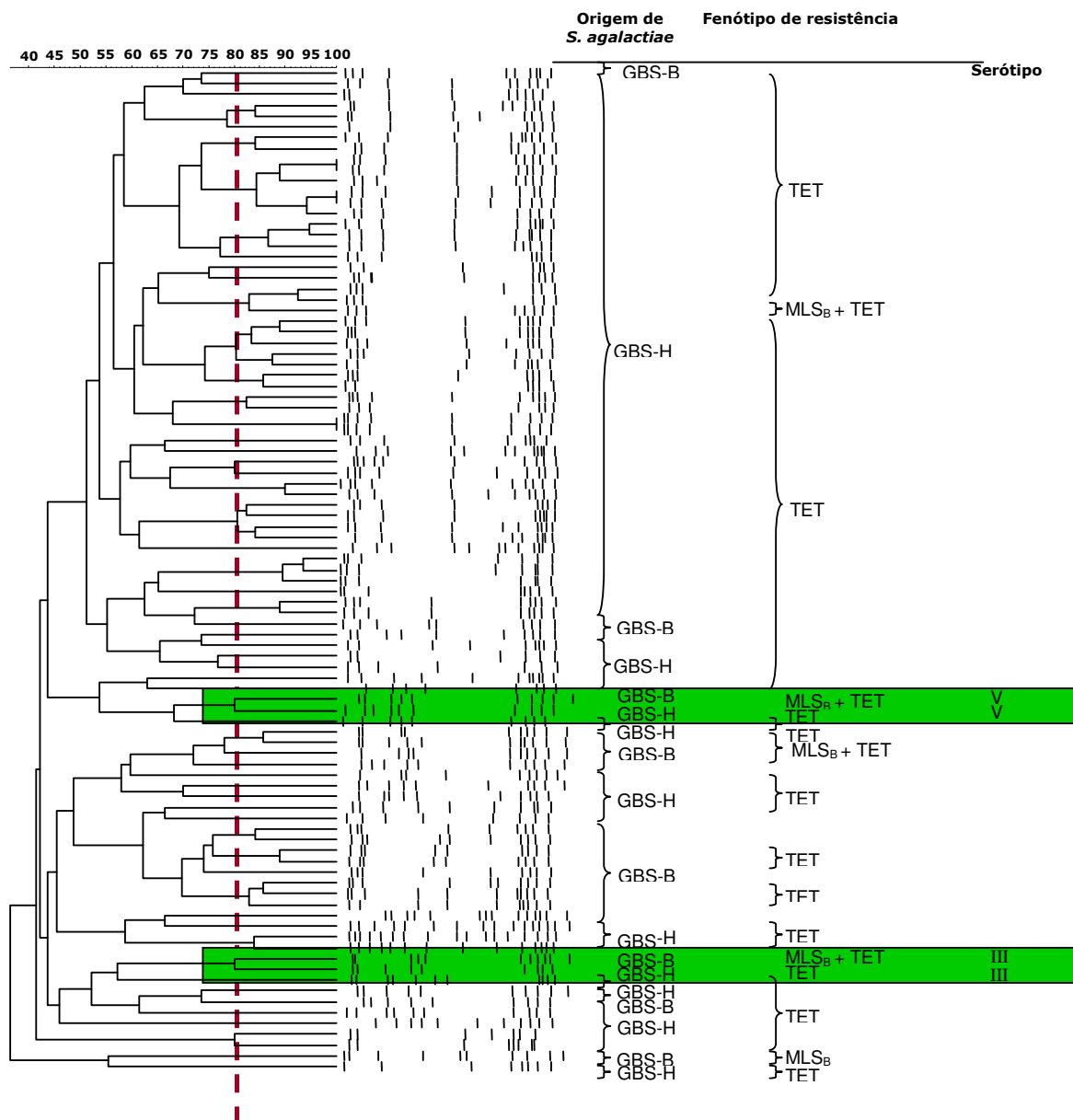


Figura 20. Dendrograma construído com os padrões gerados por PFGE usando a enzima *SmaI* de isolados representativos de *Streptococcus agalactiae* de origem bovina, deste estudo, e isolados *Streptococcus agalactiae* de origem humana, provenientes de colonização em mulheres grávidas (Nogueira *et al.* Resultados não publicados). GBS – *Streptococcus agalactiae*: GBS-B- origem bovina; GBS-H- origem humana. TET – resistência à tetraciclina; MLS_B – fenótipo MLS_B (resistência a macrólidos e lincosamidas). Está representado o serótipo dos dois isolados de origem bovina e humana que estão possivelmente relacionados (acima de 80% de semelhança - ver marcação a verde). As condições para a elaboração do dendrograma foram as seguintes: Dice (Tol 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%] – O coeficiente de semelhança utilizado foi o “Dice” e o método de agrupamento foi o “UPGMA” (*Unweigthed pair group method with arithmetic averages*). Foi utilizado uma optimização de 0,00% (representando a distância relativa que um perfil se pode mover em comprimento para se ajustar) e uma tolerância entre a posição de bandas dos diferentes perfis de restrição de 1,5%.

Foi construído um dendrograma para avaliação do grau de semelhança entre os 93 padrões de restrição PFGE dos isolados de *S. agalactiae* das diferentes origens (Fig. 20).

A maior parte dos isolados de origem humana foram posicionados num grupo separado (com diferentes graus de semelhança). Vinte e três perfis de isolados de origem humana foram posicionados junto a 19 padrões de isolados de origem bovina (com diferentes graus de semelhança).

Dois pares de padrões de isolados das diferentes origens têm pelo menos 80% de semelhança, o que nestes casos corresponde a uma variação de 8-10 bandas entre cada um dos perfis (ver Figura 20, marcação a verde).

Um dos pares de isolados são de serótipo V e o outro de serótipo III, mas possuem fenótipos de resistência diferentes. Os dois isolados de origem bovina são resistentes aos macrólidos (eritromicina) e lincosamidas (pirlimicina) e à tetraciclina, enquanto que os isolados de origem humana são resistentes apenas à tetraciclina (ver Figura 20). Os dois isolados de origem bovina são ST-2 (VSA4 e VSA10) (ver Tabela 28).

DISCUSSÃO

S. agalactiae, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *S. uberis* são importantes agentes patogénicos causadores de mastites bovinas. A prevalência destas espécies responsáveis por mastite em bovinos leiteiros em Portugal foi recentemente documentada (Bexiga *et al.*, 2005). De todos os agentes etiológicos de mastites bovinas observados, *S. agalactiae* representou 13,9%, *S. uberis* 7,4% e *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* 2,8% a partir de 459 amostras recolhidas para análise bacteriológica em 11 vacarias portuguesas.

A prevalência de *S. agalactiae* observada nas explorações em Portugal revelou ser mais elevada do que a observada em outros países. As frequências documentadas de *S. agalactiae* nos Estados Unidos foram de 4,16% (Makovec & Ruegg, 2003) e no Brasil de 6,9% (Brito *et al.*, 1998; Brito *et al.*, 1999). No Reino Unido não foram isolados *S. agalactiae* de acordo com o trabalho de Bradley & Green (2001). É mais infrequente isolar *S. agalactiae*, o que pode estar relacionado com o facto de ser um agente contagioso e por isso mais fácil de controlar a sua disseminação.

Como referido anteriormente, medidas preventivas de controlo de mastites nas explorações leiteiras, iniciadas à cerca de 10 a 20 anos, demonstraram melhor eficácia contra agentes patogénicos de natureza contagiosa do que contra agentes de natureza ambiental (Leigh, 1999; Makovec & Ruegg, 2003).

Foi observada uma prevalência de *S. uberis* (7,4%), em Portugal, mais baixa do que a observada em outros estudos, particularmente na Austrália, Nova Zelândia e Reino Unido. Nestes Países, os agentes patogénicos ambientais são mais prevalentes. Uma das razões apontadas, é o facto de se utilizar a forma extensiva de produção de bovinos leiteiros nestes Países e a utilização de pastos é possivelmente a causa de uma maior prevalência de agentes patogénicos ambientais (Pullinger *et al.*, 2006). Por exemplo, na Nova Zelândia a prevalência de *S. uberis* é de cerca de 30% (Douglas *et al.*, 2000) em relação aos restantes agentes patogénicos *Streptococcus* spp. Adicionalmente, cerca de 14% a 26% de casos clínicos de mastite bovina são devidos a *S. uberis* em Países como o Canadá, Reino Unido, Estados Unidos e Holanda (Hogan & Smith, 1997 citado em Pullinger *et al.*, 2006).

A prevalência de *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* foi a mais baixa registada entre as três espécies de *Streptococcus* estudadas neste trabalho (2,8%). Bradley & Green (2001) observaram uma frequência de 2% em *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*. Possivelmente, este agente patogénico poderá ser controlado por implementação de medidas higio-sanitárias eficientes.

Destaca-se assim, neste estudo, a elevada frequência de isolamento de *S. agalactiae* (13,9% das amostras) em Portugal. O manejo da vacaria poderá estar implicado para esta frequência mais elevada de *S. agalactiae*. A maior frequência deste agente patogénico poderá estar relacionada com a implementação menos eficiente das medidas higiénicas de controlo. Observou-se que embora todas as explorações incluídas neste estudo apliquem o “Plano de Controlo de 5 Pontos”, a forma como este plano foi implementado em algumas vacarias não garantiu a eliminação dos agentes contagiosos das explorações (Bexiga *et al.*, 2005).

Foi também documentado que os agentes patogénicos de natureza ambiental e os de natureza contagiosa demonstram diferentes características dependendo da estação do ano (Makovec & Ruegg, 2003). Estes autores observaram que o isolamento de agentes patogénicos contagiosos são mais usuais durante a época de Inverno e Verão do que nas estações Primavera e Outono. A grande maioria dos isolamentos, no que diz respeito aos isolados *S. agalactiae* utilizados neste estudo, foram feitos entre Janeiro e Março, o que poderá justificar em parte a elevada prevalência do agente patogénico *S. agalactiae* observada neste estudo.

Adicionalmente, têm sido realizados estudos destinados a conhecer os padrões de resistência a antimicrobianos em *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *S. uberis* associados a mastites bovinas (Vilela *et al.*, resultados não publicados).

O presente trabalho teve como objectivos estudar a caracterização da resistência a antimicrobianos, clonalidade e virulência de estirpes de campo *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *S. uberis* recolhidas de bovinos leiteiros em 11 explorações do Ribatejo-Oeste de 2002 a 2003. Em Portugal, a epidemiologia e a estrutura da população destes microrganismos ainda não foi documentado, o que é importante para o desenvolvimento de programas adequados de terapêutica e controlo da doença.

Em particular, o estudo da clonalidade permitiu avaliar o grau de disseminação dos isolados das três espécies, em cada uma das explorações (ver adiante, ponto 6). Foram ainda comparadas as características fenotípicas e genotípicas de resistência a alguns antimicrobianos em *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *S. uberis* permitindo complementar os estudos de susceptibilidade a antimicrobianos (ver a seguir).

1. Estudo da susceptibilidade aos antimicrobianos e fenótipos de resistência a macrólidos em *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *Streptococcus uberis*

Os β -lactâmicos são a primeira escolha na utilização de antimicrobianos em caso de mastites bovinas. De acordo com os estudos de susceptibilidade a antimicrobianos em isolados de *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *S. uberis* associados a mastites bovinas (Vilela *et al.*, resultados não publicados) não foi observada resistência a β -lactâmicos (ver Anexo1: *Comunicações em Congressos*: Bexiga *et al.* 2006. MICRO'05-BIOTEC'05, Portugal).

Os macrólidos e lincosamidas constituem a segunda escolha de antimicrobianos utilizados em caso de mastite. Antimicrobianos pertencentes a estas duas classes (eritromicina e pirlimicina) foram estudados no âmbito deste trabalho, juntamente com a tetraciclina, vancomicina, (glicopeptídeo) e cloranfenicol. Foram determinados os fenótipos de resistência aos macrólidos e genótipos associados à resistência aos macrólidos e tetraciclina.

Observámos que em *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* ou *S. uberis*, neste estudo, a resistência aos antimicrobianos testados, foi no geral, mais elevada do que as documentadas em isolados associados a mastites bovinas em outros Países (Brown & Roberts, 1991; Duarte *et al.*, 2005; Guérin-Faubleé *et al.*, 2002).

Em particular, neste estudo, a resistência observada à tetraciclina em *S. agalactiae* (65,6%) foi mais elevada do que em estudos anteriores no Brasil (44%) e França (37,5%) (Duarte *et al.*, 2004; Guérin-Faublée *et al.*, 2002). A resistência observada à tetraciclina em *S. uberis* (60%) foi mais elevada do que num estudo anterior na França (22%) (Guérin-Faublée *et al.*, 2002). Em *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* observou-se uma resistência de 100% à tetraciclina (Ver Fig. 21).

A elevada resistência à tetraciclina em Portugal, pode estar associada ao elevado consumo deste antibiótico na profilaxia em produção animal que constituiu cerca de 40-48% do total de consumo deste antimicrobiano entre 1995-1998 (Silva & Inês, 2000). Embora este antimicrobiano não seja utilizado em clínica humana no tratamento de infeções causadas por *Streptococcus* spp., o estudo da resistência a este antimicrobiano justifica-se pelo facto de a tetraciclina constituir um potencial factor de risco de aquisição de outros genes de resistência, como os determinantes de resistência a macrólidos, lincosamidas e cloranfenicol (Culebras *et al.*, 2002) (ver adiante).

A eritromicina é um antimicrobiano recomendado como de segunda escolha para o tratamento de mastites (e a primeira alternativa em casos de alergia aos antimicrobianos β -lactâmicos). No entanto, a emergência de resistência a este antimicrobiano poderá levar à supressão da sua utilização devido às implicações clínicas.

Com efeito, a emergência da resistência à eritromicina foi documentada (Betriu *et al.*, 2004; Culebras *et al.*, 2002; de Azavedo *et al.*, 2001; Denamiel *et al.*, 2005; Guérin-Faublée *et al.*, 2002), assim como a dispersão da resistência (Loch *et al.*, 2005).

Neste estudo, foi observada resistência à eritromicina em *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *S. uberis* (22-53%). Em outros trabalhos foi estimada em cerca de 17-28% em *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *S. uberis* (Denamiel *et al.*, 2005; Guérin-Faublée *et al.*, 2002).

No presente estudo a resistência à pirlimicina foi observada em *S. uberis* (53,3%) e *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (35,3%), tendo sido mais elevada em *S. uberis* que em *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*. Outros trabalhos documentaram que a pirlimicina é mais activa contra *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* do que contra *S. uberis* (Salmon *et al.*, 1998; Watts *et al.*, 1995), o que como referimos, está de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho.

A resistência à pirlimicina foi também observada em *S. agalactiae* (21,9%) neste estudo, tendo-se verificado que corresponde à resistência cruzada entre pirlimicina e eritromicina (todos os isolados *S. agalactiae* resistentes à eritromicina são cMLS_B) (ver adiante).

Isolados de *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (12%) e *S. uberis* (31%) apresentaram resistência à pirlimicina e susceptibilidade à eritromicina, o que sugere um novo fenótipo de susceptibilidade a macrólidos e resistência a lincosamidas e estreptograminas A (fenótipo LSA) descrito em isolados GBS de origem humana (Malbruny *et al.*, 2004).

Tanto quanto sabemos, é a primeira vez que este fenótipo é observado em *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*. Este fenótipo foi documentado em *S. uberis* (Guérin-Faublée *et al.*, 2002) e em *S. agalactiae* associado a mastite bovina (Denamiel *et al.*, 2005; Roberts & Brown, 1994).

A base genética e bioquímica deste tipo de resistência é ainda desconhecida (Malbruny *et al.*, 2004). No entanto, foi sugerido que possivelmente está relacionado com o gene *linB* descrito em *Enterococcus faecium* de origem humana (Bozdogan *et al.*, 1999). Será talvez importante estudar mais aprofundadamente este fenótipo (LSA) e os mecanismo(s) genético(s) associados, em trabalhos futuros, pois foi detectado em isolados *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* pela primeira vez neste estudo, e foi observado em 30% dos isolados de *S. uberis* (ver Tabela 20).

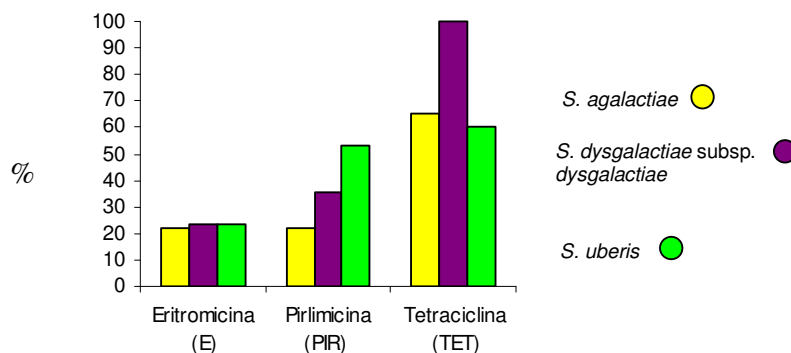


Figura 21. Percentagem de resistência aos macrólidos, lincosamidas e tetraciclina nos isolados de *S. agalactiae* (n=32), *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (n=17) e *S. uberis* (n=30), avaliada pelo método de difusão em disco (NCCLS, 2002)

Todos os isolados foram susceptíveis ao cloranfenicol, o que foi documentado em outros estudos (Guérin-Faubleé *et al.*, 2002). Caso não se tivesse verificado a susceptibilidade a este antibiótico teria sido testado a presença do gene *cat* por PCR (Trieu-Cuot *et al.*, 1993).

Verificámos que todos os isolados das três espécies eram susceptíveis à vancomicina de acordo com o ensaio para determinar a concentração mínima inibitória (MIC) (NCCLS, 2002), visto que por difusão em disco obtivemos resultados inconclusivos, tendo sido identificados isolados com susceptibilidade diminuída. Caso tivesse sido observada resistência à vancomicina, teriam sido feitos ensaios para a detecção, por PCR, da presença de genes *van* descritos em *Enterococcus* spp. and *Staphylococcus* spp. (Depardieu *et al.*, 2004). Resistência à vancomicina em espécies pertencentes ao género *Streptococcus* de origem humana foi documentada, nomeadamente em *Streptococcus bovis* (Poyart *et al.*, 1997).

Como referido anteriormente, foi observada resistência cruzada aos macrólidos (eritromicina) e lincosamidas (pirlimicina) nos isolados estudados, a qual corresponde ao fenótipo cMLS_B. Foi detectada apenas a expressão constitutiva (cMLS_B), não tendo sido observado o fenótipo indutível (iMLS_B). A prevalência do fenótipo cMLS_B em isolados de *Streptococcus* associados a mastites está documentado (Denamiel *et al.*, 2005; Duarte *et al.*, 2005). A resistência cruzada a macrólidos, lincosamidas e estreptograminas é esperada, visto que estes antimicrobianos, ainda que estruturalmente diferentes, ligam-se à subunidade 50S do ribossoma em locais estreitamente relacionados.

Verificámos que os genes *erm(B)* e *tet(O)* foram os mais frequentemente encontrados associados à resistência a eritromicina e tetraciclina respectivamente. Resultados idênticos foram observados por outros autores em *S. agalactiae* associada a mastite bovina (Duarte *et al.*, 2005).

O gene *erm(A)* que codifica para a resistência à eritromicina, foi encontrado em apenas um isolado cMLS_B de genótipo [*erm(A)*⁺*erm(B)*⁻*mef(A)*⁻]. O gene *mef(A)* que codifica para a resistência à eritromicina não foi observado em nenhum isolado. O fenótipo M também não foi observado neste estudo. Este fenótipo foi observado em *Streptococcus* spp. associados a mastite bovina (Denamiel, 2005). No entanto, segundo alguns autores, este fenótipo de resistência à eritromicina não parece ser o mais frequente entre estas espécies (Denamiel, 2005; Duarte *et al.*, 2005; Loch *et al.*, 2005).

A predominância do gene *erm(B)* em isolados de fenótipo cMLS_B tem sido observada em isolados *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *S. uberis* associados a mastites bovinas (Denamiel, 2005; Duarte *et al.*, 2005; Loch *et al.*, 2005) e em isolados *S. agalactiae* de origem humana (Poyart *et al.* 2003).

A transferência do gene *erm(B)* entre estirpes da mesma espécie e entre espécies diferentes é geralmente mediada por transposões (Loch *et al.*, 2005). A utilização continuada de macrólidos e lincosamidas em explorações leiteiras, poderá promover a transferência horizontal deste gene contribuindo assim para o aumento da resistência a estes antimicrobianos ao longo do tempo (Loch *et al.*, 2005).

Verificou-se que grande parte da resistência à tetraciclina foi mediada pelos genes *tet(O)* e *tet(K)* e não por *tet(M)*, que é considerado o gene mais comum associado à resistência a este antibiótico em outras espécies de *Streptococcus* (Roberts, 1996).

Foram encontradas, nesta colecção, associações entre o gene *erm(B)* e genes *tet* num mesmo isolado (Ver Resultados, Tabelas 21-23), nomeadamente: *erm(B)* e *tet(O)* e *tet(K)*, em *S. agalactiae*; *erm(B)* e *tet(O)* ou *erm(A)* e *tet(M)* em *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*; *erm(B)* e *tet(O)* em *S. uberis*.

Foram também encontradas associações entre genes *tet*, na ausência de *erm(B)*, como *tet(M)*, *tet(O)* e *tet(K)* ou *tet(O)* e *tet(K)* observadas em *S. agalactiae* (Ver Resultados, Tabela 21).

As associações observadas entre os genes *erm(B)* e *tet(O)* e *tet(K)* sugerem que genes de resistência à tetraciclina encontram-se no mesmo elemento genético móvel que os genes de resistência à eritromicina (Clewell *et al.*, 1995).

Serão necessários mais estudos para esclarecer o papel dos elementos genéticos móveis na disseminação de genes e emergência de novos genótipos em estirpes resistentes à tetraciclina e macrólidos. Em seis isolados de *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* não foi detectado nenhum dos oito determinantes da resistência à tetraciclina pesquisados. Será interessante alargar esta pesquisa, em trabalhos futuros, a outro(s) determinante(s) descritos como determinantes da resistência à tetraciclina em bactérias Gram-positivas.

2. Pesquisa de genes de virulência em *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*

Está descrita a transferência génica de genes de virulência entre os agentes patogénicos humanos *S. pyogenes* (*Streptococcus* do grupo A) e *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (*Streptococcus* dos grupos C ou G) (Davies *et al.*, 2005). Estes genes de virulência incluem genes que codificam para a proteína M, superantigénios, estreptoquinase e peptidase C5a (Cleary *et al.*, 1991; Igwe *et al.*, 2003; Sriprakash & Hartas, 1996; Walter *et al.*, 1989). Pouco se sabe acerca dos mediadores dessa transferência genética entre estas espécies. Sabe-se apenas que genes codificados por genomas de fagos de *S. pyogenes* ocorrem em *S. dysgalactiae*, subsp. *equisimilis*, como por exemplo os genes que codificam para superantigénios (Igwe *et al.*, 2003), o que sugere que os fagos assumem importância nessa transferência. No entanto, essa transferência de genes não foi documentada em *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*.

Os isolados de *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* desta colecção foram testados quanto à presença dos genes de virulência que codificam para superantigénios, *speA*, *speC* e *ssa* (Alouf & Müller-Alouf, 2003; Mollick *et al.*, 1993).

Estes genes são dos mais importantes factores de virulência em *S. pyogenes* porque codificam para superantigénios (SAGs) que actuam a nível do sistema imunitário humano. Os superantigénios exibem propriedades altamente potentes de transformação de linfócitos, particularmente contra as células T CD4+ e CD8+ promovendo a libertação excessiva de citocinas, provocando uma excessiva resposta do sistema regulador do hospedeiro (choque sistémico) permitindo a evasão da bactéria ao sistema imunitário (Alouf & Müller-Alouf, 2003). Esta activação excessiva e “aberrante” das células T causa danos nos tecidos e órgãos do hospedeiro, o que resulta em doença ou na morte.

Foi observado a ocorrência do gene *speC* em 29,4% dos isolados *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*. Este gene codifica para a exotoxina pirogénica SpeC de *S. pyogenes* e está contido no genoma do fago CS112 (McShan, 2000).

Estes isolados que têm o gene *speC* são provenientes de quatro explorações diferentes (E, G, F e B). A disseminação deste gene em isolados provenientes de diferentes explorações sugere que possivelmente este gene é comum nesta espécie. O facto deste gene estar presente em isolados relacionados (ver Fig. 17) sugere que possa estar presente em clones com maior capacidade de disseminação. Por outro lado, este resultado sugere que os fagos podem ter um papel importante na virulência e plasticidade genómica de *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* de origem bovina.

3. Serotipagem em *S. agalactiae*

A serotipagem teve por base identificar qual o polissacárido capsular (I a VIII) dos isolados de *S. agalactiae* de origem bovina.

Uma grande parte dos isolados (37,5%) foram identificados como não-tipáveis neste estudo.

Mosabi *et al.* (1997) documentaram no Kenya que *S. agalactiae* de origem bovina e humana eram 85% e 100% tipáveis, respectivamente. Daignault *et al.* (2003) documentaram 62% de isolados não tipáveis de *S. agalactiae* de origem bovina no Canadá.

Nos isolados tipados deste estudo, os serótipos encontrados foram o II, V, III e Ia (ver Tabela 18).

O serótipo III foi o mais frequentemente encontrado em *S. agalactiae* de bovinos no Brasil (Duarte *et al.*, 2004) e Canadá (Daignault *et al.*, 2003). O serótipo Ia foi o mais frequentemente encontrado em *S. agalactiae* de bovinos no Kenya (Mosabi *et al.*, 1997) e o II na Nova Zelândia (Finch & Martin, 1984) sugerindo que existe variação na distribuição de serótipos, o que depende da região geográfica.

Neste estudo, foi encontrada uma predominância de um mesmo serótipo em isolados *S. agalactiae* da mesma exploração (ver Tabela 18). Este resultado parece sugerir que nas explorações existem estirpes de *S. agalactiae* com serótipos específicos. No entanto, para melhor avaliar a clonalidade dos isolados e consequentemente avaliar a transmissão cruzada, outros métodos poderão ser mais adequados, nomeadamente PFGE (ver a seguir).

4. Caracterização molecular de *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *Streptococcus uberis*

Neste estudo foram utilizados dois métodos de tipagem molecular (PFGE e MLST) para caracterizar a colecção de 32 isolados de campo de *S. agalactiae* e 30 de *S. uberis* causadores de mastite bovina. Foi utilizado apenas PFGE para caracterizar os 17 isolados de campo *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* porque não foi ainda desenvolvido o esquema de sequenciação de múltiplos loci (MLST) para esta espécie (ver <http://www.mlst.net/>).

Um dos objectivos deste estudo foi investigar a epidemiologia molecular de todos os isolados de *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *S. uberis* provenientes de mastite subclínica de bovinos e analisar a estrutura das populações de *S. agalactiae* e *S. uberis*, por forma a contribuir para o conhecimento da epidemiologia desta doença a um nível global.

Como referido anteriormente, o PFGE foi utilizado para avaliar a transmissão específica de estirpes dentro e entre rebanhos. Este é considerado um método altamente discriminatório (Baseggio *et al.*, 1997; Khan *et al.*, 2003; Tenover *et al.*, 1995).

O MLST é normalmente menos discriminatório mas é um método muito útil para investigar a dinâmica de populações a um nível global (Coffey *et al.*, 2006; Maiden *et al.*, 1998; Pullinger *et al.*, 2006; Zadoks *et al.*, 2005).

O MLST assenta na variação que se acumula muito lentamente na população bacteriana, sendo muito provável que esta variação seja selectivamente neutra. É por esta razão que a tipagem por MLST se baseia na identificação de alelos directamente a partir de sequências nucleotídicas de fragmentos de genes nativos ou *housekeeping*.

Métodos que assentam na variação evolutiva que ocorre rapidamente (como o PFGE) são úteis para estudos epidemiológicos de curta duração, não sendo os mais adequados para estudos de epidemiologia global (Maiden *et al.*, 1998). Isto significa que o MLST e o PFGE são dois métodos que se complementam.

4.1. *S. agalactiae*

Os resultados dos dendrogramas construídos com os padrões de restrição *Sma*I de *S. agalactiae* mostraram que isolados recolhidos da mesma exploração são mais relacionados entre eles ou considerados clonais (80% de semelhança, ou superior), o que está de acordo com outros estudos de epidemiologia molecular, por PFGE, em *S. agalactiae* de origem bovina (Baseggio *et al.*, 1997; Duarte *et al.*, 2004; Merl *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 1999) e de origem humana (Fasola *et al.*, 1993).

Em cada exploração parece haver disseminação de um só clone pois foi observado pouca variação entre os padrões de restrição de isolados provenientes de cada uma das exploração (ver Resultados, Fig. 9). Parecem co-existir em cada exploração estirpes com iguais características fenotípicas e genotípicas (100% de semelhança) predominantes na população de *S. agalactiae*. Estes resultados confirmam que *S. agalactiae* é um agente patogénico de natureza contagiosa. A sua transmissão ocorre de animal em animal, provavelmente devido ao ambiente confinado em que os animais vivem ou através da máquina de ordenha.

Observou-se que isolados recolhidos nas explorações em diferentes datas, apresentaram padrões de restrição idênticos sugerindo que *S. agalactiae* tem a capacidade de persistir na glândula mamária durante algum tempo. Possivelmente existem determinados clones que são predominantes devido a características particulares, não identificadas. Tem sido documentado a capacidade de *S. agalactiae* de aderir às células epiteliais da glândula mamária de bovinos (Lammers *et al.*, 2001), o que pode também ser uma característica importante para a persistência deste agente patogénico na glândula mamária.

Desta forma, como referido anteriormente, o agente patogénico *S. agalactiae* é de natureza contagiosa, podendo ser eliminado pela prevenção evitando a sua disseminação e infecção através de programas adequados de manejo nas explorações.

Os seis isolados de *S. agalactiae* testados por MLST são de dois ST (ST-2 e ST-61). Estes dois ST são relacionados (com variações entre um a dois *loci*) a ST de *S. agalactiae* de origem humana, de acordo com a base de dados de MLST de *S. agalactiae* (pubmlst.org/sagalactiae/). Esta base de dados contém presentemente 271 perfis alélicos (02/07/06).

Consultando a Figura 16 verifica-se que os padrões de restrição *Sma*I idênticos correspondem a ST iguais. Verifica-se também que isolados de padrão de restrição diferentes (abaixo de 80% de semelhança) são de ST iguais (ver estirpes VSA10 e VSA4; e estirpes VSA6, VSA16 e VSA22), demonstrando neste estudo que a técnica PFGE foi mais discriminatória que a técnica MLST.

4.2. *S. uberis*

Apesar da elevada prevalência em mastite bovina desconhece-se ainda a epidemiologia de *S. uberis*, o que é limitante para conseguir controlar a infecção causada por este agente patogénico. O PFGE foi utilizado para diferenciar a colecção de 30 isolados deste estudo associados a mastite subclínica. Nove isolados pertencentes a diferentes clones definidos por PFGE foram analisados por MLST para obter a descrição da estrutura da população destes isolados. Esta análise teve como objectivo contribuir para um melhor entendimento sobre a biologia da população deste agente patogénico. O PFGE revelou 29 padrões de restrição *Sma*I indicando uma enorme heterogenia entre os

isolados *S. uberis* desta colecção, sugerindo que as infecções causadas por *S. uberis* não se devem a transmissão directa entre as vacas da exploração (Rato *et al.*, submetido para publicação).

Dos nove isolados *S. uberis* estudados por MLST foram identificados seis novos ST, cinco dos quais (ST-265, ST-266, ST-268, ST-269 e ST-270) com sete novos alelos, enquanto que o restante ST novo (ST-267) tem alelos previamente descritos na base de dados (pubmlst.org/suberis/). Este ST-267 é comum a quatro isolados, todos da mesma exploração. Apenas o ST-269 pertence a um complexo clonal que inclui isolados da Nova Zelândia, Austrália e Reino Unido.

Tanto quanto sabemos, este é o primeiro trabalho que documenta a epidemiologia molecular e estrutura da população em isolados *S. uberis* de origem bovina em Portugal. Adicionalmente, estes resultados representam novas estruturas genómicas em *S. uberis* (ver Anexo2: Artigo submetido para publicação).

A base de dados pubmlst.org/suberis/ contém presentemente 270 perfis alélicos (02/07/06).

4.3. *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*

A análise por PFGE revelou uma grande diversidade genotípica em *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, pois foram observados 14 padrões de restrição *Sma*I em 17 isolados testados.

É de salientar a existência de dois isolados de explorações distintas (I e J) com o mesmo padrão de restrição e portanto considerados a mesma estirpe.

A existência de isolados de *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* de perfis idênticos provenientes de zonas geográficas distintas foi anteriormente documentada (Baseggio *et al.*, 1997) utilizando a técnica PFGE. Adicionalmente, Aarestrup & Jensen (1996), por ribotipagem, observaram grande semelhança entre estirpes provenientes de locais geográficos distintos (Dinamarca e EUA). Estes autores sugerem que *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, muito provavelmente, está adaptado tanto a sobreviver na glândula mamária das vacas leiteiras como no ambiente que as rodeia justificando a sua disseminação geográfica.

Tem sido documentada a disseminação de estirpes na mesma exploração e entre explorações diferentes (Aarestrup & Jensen, 1996; Baseggio *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1999), sugerindo que este agente patogénico causador de mastites bovinas é considerado de natureza contagiosa e ambiental.

Resultado idêntico a este foi observado neste trabalho. A maioria dos *clusters* de isolados com semelhança acima dos 80%, são compostos por isolados provenientes de explorações diferentes.

Clones da mesma exploração foram também detectados, nomeadamente um clone constituídos por dois isolados da exploração G a 100% de semelhança (ver Fig. 17).

Não foi possível obter a restrição do DNA de um isolado com a enzima *Sma*I, no entanto, foi possível com outra endonuclease de restrição, a *Sfi*I, demonstrando a integridade do DNA. Esta observação foi descrita em *S. agalactiae* de origem bovina (Merl *et al.*, 2003) e origem humana (Fasola *et al.*, 1993). Foi sugerido que uma metilação do local de corte da enzima no cromossoma da bactéria pode causar a incapacidade da endonuclease de restrição em cortar o DNA (Gardiner, 1991).

Conclusões

Este estudo contribuiu para o conhecimento sobre a epidemiologia molecular, resistência aos antimicrobianos e virulência das principais espécies patogénicas responsáveis por mastite subclínica em bovinos leiteiros de explorações portuguesas.

A resistência cruzada a macrólidos (eritromicina) e lincosamidas (pirlimicina) foi observada em isolados das três espécies, correspondendo ao fenótipo constitutivo MLS_B mediado por *erm*(B), excepto num isolado *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* *erm*(A)⁺*erm*(B)⁻*mef*(A)⁻.

A resistência às lincosamidas (pirlimicina) e susceptibilidade a macrólidos (eritromicina) foi observada em isolados *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *S. uberis*, sugerindo o novo fenótipo (LSA) descrito recentemente em *S. agalactiae* de origem humana.

A resistência à tetraciclina foi elevada e mediada predominantemente pelo gene *tet*(O) e *tet*(K) e não pelo *tet*(M) como se tem observado em outros *Streptococcus* spp.

A associação do gene *erm*(B) e dos genes *tet*(O) e *tet*(K) sugere que genes de resistência à tetraciclina e à eritromicina se encontram em elementos genéticos móveis comuns.

Foi observado que geralmente isolados provenientes da mesma exploração apresentaram fenótipos e genótipos de resistência a antimicrobianos idênticos. No entanto, os fenótipos variaram entre explorações diferentes, sugerindo que podem ter sido utilizados diferentes antimicrobianos em terapia para o tratamento de mastites em bovinos nas diferentes explorações.

Foi observado um maior grau de polimorfismo entre-espécies em *S. uberis* e *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* do que em *S. agalactiae*, baseado na análise de padrões de restrição *Sma*I obtidos por electroforese em campo pulsado (PFGE).

A heterogeneidade encontrada em *S. uberis* e *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* está de acordo com estudos feitos anteriormente, que sugerem que estes agentes patogénicos provocam infecção a partir de reservatórios no ambiente das vacas.

A ocorrência frequente de padrões de restrição *Sma*I idênticos entre isolados *S. agalactiae* dentro da mesma exploração sugere disseminação por transmissão directa deste agente patogénico.

Os serótipos mais prevalentes encontrados em *S. agalactiae* foram o II, V, III e Ia, e 37,5% dos isolados *S. agalactiae* foram identificados como não-tipáveis. Foi observada predominância de um mesmo serótipo em isolados *S. agalactiae* da mesma exploração.

Nos isolados *S. uberis*, testados por sequenciação de múltiplos *loci* (MLST), foram identificados seis novos perfis alélicos (ST-265, ST-266, ST-268, ST-269 e ST-270), cinco dos quais com sete alelos novos, o que representa novas estruturas genómicas em *S. uberis*. Um dos ST (ST-269) pertence a um complexo clonal que inclui isolados da Nova Zelândia, Austrália e Reino Unido.

Com base nos resultados de PFGE foram observados dois clones putativos (um de serótipo V e outro de serótipo III) em isolados GBS de origem humana e bovina. Nos isolados *S. agalactiae* testados por MLST, foram encontrados dois ST (ST-2 e ST-61) relacionados (com variação de um ou dois *loci*) com ST de origem humana.

O gene de virulência *speC*, codificado por um genoma fágico de *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* do grupo A, GAS) um agente patogénico humano, foi detectado em 29,4% dos isolados GCS, o que indica que os fagos podem contribuir para a diversidade genética e virulência de GCS de bovinos.

Parte destes resultados foram incluídos em duas Comunicações em Congressos e num Artigo de investigação submetido para publicação (Ver Anexos 1 e 2)

Perspectivas futuras

Será importante estudar mais aprofundadamente alguns aspectos abordados neste trabalho, e dar continuidade ao estudo de isolados de *Streptococcus* spp. associados a mastites bovinas em explorações de bovinos de leite.

Um dos objectivos será alargar o estudo da clonalidade e características genotípicas em mais isolados de campo representativos de *Streptococcus* spp. - *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *S. uberis* associados a mastites subclínicas de bovinos e ovinos de diversas explorações com características distintas.

Outro objectivo será comparar a diversidade genética entre isolados destas mesmas espécies recolhidas de diversas origens e outros hospedeiros: (i) no ambiente dos bovinos e ovinos; (ii) de locais de infecção e colonização em cães; (iii) *S. agalactiae* e *S. dysgalactiae* subsp. *equisimili* de origem humana isolados de locais de infecção e colonização.

Para a comparação das estirpes serão utilizadas as técnicas electroforese em gel de agarose por campo pulsado (PFGE) e sequenciação de múltiplos *loci* (MLST), determinada a resistência a antimicrobianos, genotipagem de factores de virulência e avaliação do papel dos fagos, e de outros elementos genéticos móveis, na aquisição de factores de virulência e diferenciação de estirpes.

Estes estudos irão esclarecer se a transmissão cruzada é específica entre espécies, e/ou específica entre rebanhos e determinar a importância putativa dos reservatórios ambientais na incidência da mastite. Adicionalmente, a transmissão entre espécies de origem animal e humana serão avaliadas (ver Anexo3: *Plano de Doutoramento*, 2006).

Bibliografia

Aarestrup, F. M. 2004. Monitoring of antimicrobial resistance among food animals: principles and limitations. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Public Health.* **51**:380-388.

Aarestrup, F. M., N. E. Jensen. 1996. Genotypic and phenotypic diversity of *Streptococcus dysgalactiae* strains isolated from clinical and subclinical cases of bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* **53**:315-323.

Almeida, R. A., S. P. Oliver. 1995. Invasion of Bovine Mammary Epithelial Cells by *Streptococcus dysgalactiae*. *J. Dairy Sci.* **78**:1310-1317.

Alouf, J. E., H. Müller-Alouf. 2003. Staphylococcal and streptococcal superantigens: molecular, biological and clinical aspects. *Int. J. Med. Microbiol.* **292**:429-440.

Aminov, R. I., N. Garrigues-Jeanjean. R. I. Mackie. 2001. Molecular ecology of tetracycline resistance: Development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:22-23.

Arpin, C., M. H. Canon, P. Noury, C. Quentin. 1999. Emergence of *mefA* and *mefE* genes in beta-haemolytic streptococci and pneumococci in France. *J. Antimicrob. Chemother.* **44**:133-138.

Baseggio, N., P. D. Mansell, J. W. Browning, G. F. Browning. 1997. Strain differentiation of isolates of streptococci from bovine mastitis by pulsed-field gel electrophoresis. *Molec. Cellular Probes.* **11**:349-354.

Bentley, R. W., J. A. Leigh. 1995. Development of PCR-Based Hybridization Protocol for Identification of Streptococcal Species. *J. Clin. Microbiol.* **33**:1296-1301.

Betriu, C., C. Doit, P. Bidet, N. Brahimi, D. Deforche. 2004. In vitro activities of tigecycline against erythromycin resistant *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus agalactiae*: mechanisms of macrolide and tetracycline resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:323-325.

Bexiga R., Cavaco, L. M., Vilela, C. L. 2005. Subclinical bovine mastitis in the Ribatejo-Oeste area. *Rev. Port. Cienc. Vet., in press.*

Bozdogan, B., L. Berrezouga, M.-S. Kuo, D. A. Yurek, K. A. Farley, B. J. Stockman, R. Leclercq. 1999. A new resistance gene, *linB*, conferring resistance to lincosamides by nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. **43**:925-929.

Blowey, R., P. Edmondson. 1995. Mastitis control in dairy herds. Ipswich, Farming Press.

Bradley, A. J. 2002. Bovine mastitis: An evolving disease. *Vet. J.* **164**:116-128.

Bradley, A. J., M. J. Green. 2001. Aetiology of clinical mastitis in six Somerset dairy herds. *Vet Rec.* **148**:683-686.

Bramley, A. J., F. H. Dodd. 1984. Reviews of the progress of dairy science: Mastitis control – progress and prospects. *J. Dairy Res.* **51**:481-512.

Bramley, A. J., J. E. Hillerton, T. M. Higgs, E. M. Hogben. 1985. The carriage of summer mastitis pathogens by muscid flies. *Br. Vet. J.* **141**:618-627.

Brito, M. A. V. P., J. R. F. Brito, H. M. De Souza, O. L. Vargas. 1998. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. *Pesq. Vet. Bras.* **18**:39-44.

Brito, M. A. V. P., J. R. F. Brito, M. T. Ribeiro, V. M. O. Veiga. 1999. Dairy herds pattern of intramammary infection: evaluation of all mammary quarters of lactating cows. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* **51**: 129-135.

Brown, M. B., M. C. Roberts. 1991. Tetracycline resistance determinants in streptococcal species isolated from the bovine mammary gland. *Vet. Microbiol.* **29**:173-180.

Brüssow H., Canchaya C., Hardt W. D. 2004. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**:560-602.

Calvinho, L. F., R. A. Almeida, S. P. Oliver. 1998. Potential virulence factors of *Streptococcus dysgalactiae* associated with bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* **61**:93-110.

Carle, G. F., M. Frank, M. V. Olson. 1986. Electrophoretic separation of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. *Science* **232**:65-68.

Chopra, I., M. Roberts. 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**:232-260.

Chu, G., D. Vollrath, R. W. Davis. 1986. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science.* **234**:1582-1585.

Chung, M, de Lencastre H, Matthews P, Tomasz A, Adamsson I, Aires de Sousa M, Camou T, Cocuzza C, Corso A, Couto I, Dominguez A, Gniadkowski M, Goering R, Gomes A, Kikuchi K, Marchese A, Mato R, Melter O, Oliveira D, Palacio R, Sa-Leao R, Santos Sanches I, Song JH, Tassios PT, Villari P; Multilaboratory Project Collaborators. 2000. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb. Drug Resist.* **6**:189-198.

Clancy, J., F. Dib-Hajj, J. W. Petitpas, W. Yuan. 1997. Cloning and characterization of a novel macrolide efflux gene, *mreA*, from *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2719-2723.

- Cleary, P. P., J. Peterson, C. Chen, C. Nelson.** 1991. Virulent human strains of group G streptococci express a C5a peptidase enzyme similar to that produced by group A. **59**:2305-2310.
- Clewell, D. B., S. E. Flannagan, D. D. Jaworski, D. B. Clewell.** 1995. Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons. *Trends Microbiol.* **3**:229-236.
- Coffey, T. J., G. D. Pullinger, R. Urwin, K. A. Jolley, S. M. Wilson, M. C. Maiden, Leigh J. A.** 2006. First insights into the evolution of *Streptococcus uberis*: a multilocus sequence typing scheme that enables investigation of its population biology. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:1420-1428.
- Culebras, E., I. Rodriguez-Avial, C. Betriu, M. Redondo, J. J. Picazo.** 2002. Macrolide and tetracycline resistance and molecular relationships of clinical strains of *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1574-1576.
- Cunningham, M. W.** 2000. Pathogenesis of Group A streptococcal infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**:470-511.
- Daignault, D, E. Guévremont, J.-M. Guillemette, S. Messier, M. Gottschalk, R. Higgins.** 2003. Serotypes of *Streptococcus agalactiae* cultured from dairy milk samples in Québec. *Can. Vet. J.* **44**:217-220.
- Davies, M. R., T. N. Tran, D. J. McMillan, D. L. Gardiner, B. J. Currie, K. S. Sriprakash.** 2005. Inter-species genetic movement may blur the epidemiology of streptococcal diseases in endemic regions. *Microbes Infect.* **7**:1128-1138.
- de Azavedo, J., M. McGavin, C. Duncan, D. E. Low, A. McGeer.** 2001. Prevalence and mechanisms of macrolide resistance in invasive and non-invasive group B streptococcus isolates from Ontario, Canada. *Antimicro. Agents Chemother.* **45**:3504-3508.
- Denamiel, G., P. Llorente, M. Carabella, M. Rebuelto, E. Gentilini.** 2005. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus* spp. isolated from bovine mastitis in Argentina. *J. Vet. Med.* **B52**:125-128.
- Depardieu, F., B. Perichon, P. Courvalin.** 2004. detection of the *van* Alphabet and identification of Enterococci and Staphylococci at the species level by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **42**:5857-5860.
- Douglas, V. L., S. G. Fenwick, D. U. Pfeiffer, N. B. Williamson, C. W. Holmes.** 2000. Genomic typing of *Streptococcus uberis* isolates from cases of mastitis, in New Zealand dairy cows, using pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* **75**:27-41.
- Duarte, R. S., B. C. Bellei, O. P. Miranda, M. A. V. P. Brito, L. M. Teixeira.** 2005. distribution of antimicrobial resistance and virulence-related genes among Brazilian Group B streptococci recovered from bovine and human sources. **49**:97-103.

- Duarte, R. S., O. P. Miranda, B. C. Bellei, M. Aparecida, V. P. Brito, L. M. Teixeira.** 2004. Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil. J. Clin. Microbiol. **42**:4214-4222.
- Enright, M. C., B. G. Spratt, A. Kalia, J. H. Cross, D. E. Bessen.** 2001. Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* and the relationships between emm type and clone. Infect Immun. **69**:2416-27.
- Erskine, R. J., S. Wagner, F. J. Degraives.** 2003. Mastitis therapy and pharmacology. Vet. Clin. Food Anim. **19**:109-138.
- Facklam, R.** 2002. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. Clin. Microbiol. Rev. **15**:613-630.
- Fasola, E., C. Livdahl, O. Ferrieri.** 1993. Molecular analysis of multiple isolates of the major serotypes of group B streptococci. J. Clin. Microbiol. **31**:2616-2620.
- Feil, E. J, B. C. Li, D. M. Aanensen, W. P. Hanage, B. G. Spratt.** 2004. eBURST : inferring patterns of evolutionary descend among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. J. Bacteriol. **186**:1518-1530.
- Ferretti J. J., Ajdic D., McShan W. M.** 2004. Comparative genomics of streptococcal species. Indian J. Med. Res. **119** Suppl:1-6.
- Finch, L. A., D. R. Martin.** 1984. Human and bovine group B streptococci: two distinct populations. J. Appl. Bacteriol. **57**:273-278.
- Fischetti, V. A.** 1989. Streptococcal M protein: molecular design and biological behavior. Clin. Microbiol. Rev. **2**:285-314.
- Fluit, A. D. C., M. R. Visser, F. J. Schmitz.** 2001. Molecular detection of antimicrobial resistance. Clin. Microbiol. Rev. **14**:836-871.
- Fontaine, M. C, J. Perez-Casal, Xin-Ming Song, J. Shelford, P. J. Willson, A. A. Potter.** 2002. Immunisation of dairy cattle with recombinant *Streptococcus uberis* GapC or a chimeric CAMP antigen confers protection against heterologous bacterial challenge. Vaccine. **20**:2278-2286.
- Gardiner, K.** 1991. Pulsed field gel electrophoresis. Anal. Chem. **63**:658-665.
- Gruet, P., P. Maincent, X Berthelot, V. Kaltsatos.** 2001. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. Adv. Drug Deliv. Rev. **50**:245:259.
- Guérin-Faubleé, V., F. Tardy, C. Bouveron, G. Carret.** 2002. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus* species isolated from clinical mastitis in dairy cows. Int J Antimicrob Agents. **19**:219-226.

Hakansson, S., L. G. Burman, J. Henrichsen, S. E. Holm. 1992. Novel coagglutination method for serotyping Group B Streptococci. *J. Clin. Microbiol.* **30**:3268-3269.

Jasir, A., A. Tanna, A. Efstratiou, C. Schalén. 2001. Unusual occurrence of M Type 77, antibiotic-resistant Group A streptococci in Southern Sweden. **39**:586-590.

Jayarao, B. M., S. P. Oliver. 1992. Aminoglycoside-Resistant *Streptococcus* and *Enterococcus* Species Isolated from Bovine Mammary Secretions. *J. Dairy Sci.* **75**:991-997.

Igwe, E. I., P. L. Shewmaker, R. F. Facklam, M. M. Farley, C. V. Beneden, B. Beall. 2003. Identification of superantigen genes *speM*, *ssa*, and *smeZ* in invasive strains of beta-hemolytic group C and G streptococci recovered from humans. *FEMS Microbiol. Lett.* **229**:259-264.

Jones, N., J. F. Bohnsack, S. Takahashi, K. A. Oliver, M-S. Chan, F. Kunst, P. Glaser, C. Rusniok, D. W. M. Crook, R. M. Harding, N. Bisharat, B. G. Spratt. 2003. Multilocus sequence typing system for group B streptococcus. *J. Clin. Microbiol.* **41**:2530-2536.

Lammers, A., C. J. van Vorstenbosch, J. H. F. Erkens, H. E. Smith. 2001. The major bovine mastitis pathogens have different cell tropisms in cultures of bovine mammary gland cells. *Vet. Microbiol.* **80**:255-265.

Lancefield, R. 1933. A serological differentiation of human and other groups of haemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* **57**:571-595.

Leclercq, R., P. Courvalin. 1991. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:1267-1272.

Leigh, J. A. 1999. Review: *Streptococcus uberis*: A permanent barrier to the control of bovine mastitis? *Vet. J.* **157**:225-238.

Leigh, J. A., J. M. Finch, T. R. Field, N. C. Real, A. Winter, A. W. Walton, S. M. Hodgkinson. 1999. Vaccination with the plasminogen activator from *Streptococcus uberis* induces an inhibitory response and protects against experimental infection in the dairy cow. *Vaccine.* **17**:851-857.

Levy, S. B, L. M. McMurry, T. M. Barbosa, V. Burdett, P. Courvalin, W. Hillen, M. C. Roberts, J. I. Rood, D. E. Taylor. 1999. Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. **43**:1523-1524.

Loch, I. M., K. Glenn, R. N. Zadoks. 2005. Macrolide and lincosamide resistance genes of environmental streptococci from bovine milk. *Vet. Microbiol.* **111**:133-138.

Lodder, G., S. Schwarz, P. Gregory, K. Dyke. 1996. Tandem duplication in *ermC* translational attenuator of the macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance

plasmid pSES6 from *Staphylococcus equorum*. Antimicrob. Agents Chemother. **40**:215-217.

Luna, V. A., P. Coates, E. A. Eady, J. H. Cove, T. T. H. Nguyen, M. C. Roberts. 1999. A variety of gram-positive bacteria carry mobile *mef* genes. J. Antimicrob. Agents. **44**:19-25.

Khan, I. U., A. A. Hassan, A. Abdulmawjood, C. Lämmeler, W. Wolter, M. Zschöck. 2003. Identification and epidemiological characterization of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis using conventional and molecular methods. J. Vet. Sci. **4**:213-223.

Kingwill, R. G. (1981). The NIRD-CVL mastitis control method. In *Mastitis Control and Herd Management*, Tech. Bull. 4, National Institute for Research in Dairying, Reading, England, 24-39.

Klugman, K. P., T. Capper, C. A. Widdowson, H. J. Koornhof, W. Moser. 1998. Increased activity of 16-membered lactone ring macrolides against erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae*: characterization of South African isolates. **42**:729-734.

Kruse, H., H. Sørum. 1994. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. Appl. Environ. Microbiol. **60**:4015-4021.

Madsen, M., G. H. Sorensen, S. A. Nielsen. 1991. Studies of the possible role of cattle nuisance flies, especially *Hydrotaea irritans*, in the transmission of summer mastitis in Denmark. Med. Vet. Entomol. **5**:421-429.

Maiden, M. C. J., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russel, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman, B. G. Spratt. 1998. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **95**:3140-3145.

Malbruny B., A. M. Werno, T. P. Anderson , D. R. Murdoch , R. Leclercq. 2004. A new phenotype of resistance to lincosamide and streptogramin A-type antibiotics in *Streptococcus agalactiae* in New Zealand. J. Antimicrob. Chemother. **54**:1040-1044.

Malke, H. 2000. Genetics and pathogenicity factors of group C and G Streptococci. Cap. 16. In Gram positive pathogens, editado por V. A. Fischetti et al. 2000. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

Makovec, J. A., P. L. Ruegg. 2003. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. J. Dairy Sci. **86**:3466-3472.

McDonald, W. L., B. N. Fry, M. A. Deighton. 2005. Identification of *Streptococcus* spp. Causing bovine mastitis by PCR-RFLP of 16S-23S ribosomal DNA. Vet. Microbiol. **111**:241-246.

McShaw W. M. 2000. The bacteriophages of group A Streptococci. Cap. 11. *In* Gram positive pathogens, editado por V. A. Fischetti et al. 2000. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

Merl, K., A. Abdulmawjood, C. Lämmeler, M. Zschöck. 2003. Determination of epidemiological relationships of *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis. FEMS Microbiol. Lett. **226**:87-92.

Mollick, J. A., G. G. Miller, J. M. Musser, R. G. Cook, D. Grossman, R. R. Rich. 1993. A novel superantigen isolated from pathogenic strains of *Streptococcus pyogenes* with aminoterminal homology to Staphylococcal enterotoxins B and C. J. Clin. Invest. **92**:710-719.

Mosabi, J. M., S. M. Arimi, E. K. Kang'ethe. 1997. Isolation and characterization of group B streptococci from human and bovine sources within and around Nairobi. Epidemiol. Infect. **118**:215-220.

Murray, P. 2004. *In* Manual of Clinical Microbiology, 8th Edition. ASM Press.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard_Second Edition M31-A2, vol. 22. No. 6. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

Ng., L.-K., I. Martin, M. Alfa, M. Mulvey. 2001. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. Mol. Cell. Probes. **15**:209-215.

Owens, W. E., C. H. Ray, J. L. Watts, R. J. Yancey. 1997. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. J. Dairy Sci. **80**:313-317.

Paoletti, L. C., L. C. Madoff, D. L. Kasper. 2000. Surface structures of group B *Streptococcus* important human immunity. Cap. 14. *In* Gram positive pathogens, editado por V. A. Fischetti et al. 2000. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

Phuektes, P., P. D. Mansell, R. S. Dyson, N. D. Hooper, J. S. Dick, G. F. Browning. 2001. Molecular epidemiology of *Streptococcus uberis* isolates from dairy cows with mastitis. J. Clin. Microbiol. **39**:1460-1466.

Piddock, L. J. V. 1996. Does the use of antimicrobial agents in veterinary medicine and animal husbandry select antibiotic-resistant bacteria that infect man and compromise antimicrobial chemotherapy? J. Antimicrob. Chemother. **38**:1-3.

Pires, R., D. Rolo, L. Gama-Norton, A. Morais, L. Lito, M. J. Salgado, C. Johansson, G. Möllerberg, B. Henriques-Normark, J. Gonçalo-Marques, I. Santos-Sanches. 2005. Group A Streptococci from Carriage and Disease in Portugal: Evolution of Antimicrobial Resistance and T Antigenic Types During 2000-2002. Microb. Drug Resist. **11**:360-370.

- Poyart, C., C. Pierre, G. Quesne, B. Pron, P. Berche, P. Trieu-Cuot.** 1997. Emergence of Vancomycin Resistance in the Genus *Streptococcus*: Characterization of a *vanB* Transferable Determinant in *Streptococcus bovis*. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **41**:24-29.
- Poyart, C., L. Jardy, G. Quesne, P. Berche, and P. Trieu-Cuot.** 2003. Genetic basis of antibiotic resistance in *Streptococcus agalactiae* strains isolated in a French hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:794-797.
- Pullinger, G.D., M. Benavides, T.J. Coffey, J.H. Williamson, R.T. Cursons, E. Summers, J. Hulbert, M. C. Maiden, J. A. Leigh.** 2006. Application of *Streptococcus uberis* Multilocus Sequence Typing: Analysis of the Population Structure Detected among Environmental and Bovine Isolates from New Zealand and the United Kingdom. *Appl Environ Microbiol.* **72**:1429-36.
- Radostits, O. M.** 1994. Herd health, food animal production medicine. Saunders Company.
- Rato M., Bexiga R., Nunes S. F., Cavaco L. M, Vilela C. L., Santos-Sanches I.** Molecular Epidemiology and population structure of bovine *Streptococcus uberis* isolates from Portuguese dairy farms. *Appl. Environ. Microbiol.* AEM00788-06.
- Reda, K. B., V. Kapur, J. A. Mollick, J. G. Lamphear, J. M. Musser, R. R. Rich.** 1994. molecular characterization and phylogenetic distribution of streptococcal superantigens gene (*ssa*) from *Streptococcus pyogenes*. **62**:1867-1874.
- Roberts, M. C.** 1996. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol. Rev.* **19**:1-24.
- Roberts, M. C., M. B. Brown.** 1994. Macrolide-lincosamide resistance determinants in streptococcal species isolated from the bovine mammary gland. *Vet. Microbiol.* **40**:253-261.
- Roberts, M. C., J. Sutcliffe, P. Courvalin, L. B. Jensen, J. Rood, H. Seppala.** 1999. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. **43**:2823-2830.
- Robinson, J. H., M. A. Kehoe.** 1992. Group A streptococcal M proteins: virulence factors and protective antigens. *Immunol. Today.* **13**:362-367.
- Rossitto, P. V., L. Ruiz, Y. Kikuchi, K. Glenn, K. Luiz, J. L. Watts, J. S. Cullor.** 2002. Antibiotic susceptibility patterns for environmental streptococci isolated from bovine mastitis in Central California dairies. **85**:132-138.
- Salmon, S. A., J. L. Watts, F. M. Aarestrup, J. W. Pankey, R. J. Yancey.** 1998. Minimum inhibitory concentrations for selected antimicrobial agents against organisms

isolated from the mammary gland of dairy heifers in New Zealand and Denmark. J. Dairy Sci. **81**:570-578.

Salyers, A. A., N. B. Shoemaker, A. M. Stevens, L. Y. Li. 1995. Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. Microbiol. Rev. **59**:579-590.

Salyers, A. A., C. F. Amábile-Cuevas. 1997. Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination? Antimicrob. Agents Chemother. **41**:2321-2325.

Sambrook J., and D. W. Russell. (2001) Molecular Cloning - A Laboratory Manual. 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Schwartz, D. C., C. R. Cantor. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by Pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell. **37**:67-75.

Seegers, H., C. Fourichon, F. Beaudeau. 2003. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. Vet. Res. **34**:475-491.

Seppälä, H., A. Nissinen, P. Huovinen. 1993. Three different phenotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Finland. J. Antimicrob. Chemother. **32**:885-891.

Schuchat, A. 1998. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. Clin. Microbiol. Rev. **11**:497-513.

Schuchat, A. 2001. group B streptococcal disease: from trials and tribulations to triumph and trepidation. Clin. Infect. Dis. **33**:751-756.

Schuchat, A., S. S. Zywicki, M. J. Dinsmoor, B. Mercer, J. Romaguera, M. J. O'Sullivan, D. Patel, M. T. Perters, B. Stoll, O. S. Levine, The Prevention of Early-Onset Neonatal Sepsis (PENS) Study Group. 2000. Risk factors and opportunities for prevention of early –onset neonatal sepsis: a multicenter case-control study. Pediatrics **105**:21-26.

Silva, E. A., M. Inês. 2000. Estudo de utilização de antimicrobianos em Portugal. Divisão de Estudos Económicos e Estatísticos, Instituto Nacional de Farmácia e do Medicamento (INFARMED), Portugal. 7º Encontro Nacional de Economia da Saúde. Novembro 16-17 2000. Lisboa. Portugal.

Smith, K. L., J. S. Hogan. 1993. Environmental mastitis. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. **9**:489-498.

Sriprakash, K. S., J. Hartas. 1996. Lateral genetic transfers between group A and G streptococci for M-like genes are ongoing. Microb. Pathog. **20**:275-285.

Sutcliffe, J., A. Tait-Kamradt, L. Wondrack. 1996. *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system. Antimicrob. Agents Chemother. **40**:1817-1824.

Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**:2233-2239.

Todhunter, D. A., K. L. Smith, J. S. Hogan. 1995. Environmental Streptococcal Intramammary Infections of the Bovine Mammary Gland. *J. Dairy Sci.* **78**:2366-2374.

Trieu-Cuot, P., G. de Cespedes, F. Bentorcha, F. Delbos, E. Gaspar, T. Horaud. 1993. Study of heterogeneity of chloramphenicol acetyltransferase (CAT) genes in streptococci and enterococci by polymerase chain reaction: characterization of a new CAT determinant. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:2593-2598.

Vandamme, P., B. Pot, E. Falsen, K. Kersters, L. Al. Devriese. 1996. Taxonomic Study of Lancefield Streptococcal Groups C, G, and L (*Streptococcus dysgalactiae*) and Proposal of *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**:774-781.

Vasi, J., L. Frykberg, L. E. Carlsson, M. Lindberg, B. Guss. 2000. M-Like Proteins of *Streptococcus dysgalactiae*. *Infect. Immun.* **68**:294-302.

Vieira, V. V., L. M. Teixeira, V. Zahner, H. Momen, R. R. Facklam, A. G. Steigerwalt, D. J. Brenner, A. C. D. Castro. 1998. Genetic relationships among the different phenotypes of *Streptococcus dysgalactiae* strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:1231-1243.

Vintov, J., Aarestrup F. M., Zinn C. E., Olsen J. E. 2003. Association between phage types and antimicrobial resistance among bovine *Staphylococcus aureus* from 10 countries. *Vet. Microbiol.* **95**:133-147.

Walter, F., M. Siegel, H. Malke. 1989. Nucleotide sequence of the streptokinase gene from a group-G Streptococcus. *Nucleic Acids Res.* **17**:1262.

Wang, S. M., M. A. Deighton, J. A. Capstick, N. Gerraty. 1999. Epidemiological typing of bovine streptococci by pulsed-field gel electrophoresis. *Epidemiol. Infect.* **123**: 317-324.

Watts, J. L., S. A. Salmon, R. J. Yancey, JR. 1995. Antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from the mammary glands of dairy heifers. **78**:1637-1648.

Weisblum, B. 1995 (a). Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:577-585.

Weisblum, B. 1995 (b). Insights into erythromycin action from studies of its activity as inducer of resistance. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **39**: 797-805.

Weisblum, B. 2000. Resistance to the macrolide-lincosamide-streptogramin antibiotics. Cap. 69. Cap. 14. *In* Gram positive pathogens, editado por V. A. Fischetti et al. 2000. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

- Werckenthin, C., S. Schwarz, H. Westh.** 1999. Structural alterations in the translational attenuator of consecutively expressed *ermC* genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1681-1685.
- White, D. G., P. F. McDermott.** 2001. Emergence and Transfer of Antibacterial Resistance. *J. Dairy Sci.* **84**:E151-E155.
- Witte, W.** 1998. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science.* **279**:996-997.
- Zadoks, R. N., B. E. Gillespie, H. W. Barkema, O. C. Sampimon, S. P. Oliver, Y. H. Schukken.** 2003. clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. *Epidemiol. Infect.* **130**:335-349.
- Zadoks, R. N., Y. H. Schukken, M. Wiedmann.** 2005. Multilocus sequence typing of *Streptococcus uberis* provides sensitive and epidemiologically relevant subtype information and reveals positive selection in the virulence gene *pauA*. *J. Clin. Microbiol.* **43**:2407-2417.

“Sites” da Internet consultados

<http://www.mlst.net/>

<http://pubmlst.org>

<http://pubmlst.org/sagalactiae/>

<http://pubmlst.org/suberis/>

<http://eburst.mlst.net>

<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/doc.htm>

<http://sagalactiae.mlst.net>

ANEXO 1. Comunicações em Congressos:

M. Rato, D. Rolo, R. Bexiga, S. F. Nunes, L. M. Cavaco, F. Nogueira, F. Exposto, C. L. Vilela, I. Santos-Sanches. 2005. Antimicrobial Resistant Traits and Molecular Epidemiology of Streptococci from Bovine Mastitis. 7th European Congress of Chemotherapy and Infection, Florence, Italy, October 19-22, 2005. (<http://www.oic.it/ecc2005/>).

R. Bexiga, M. Rato, S. F. Nunes, D. Rolo, L. M. Cavaco, I. Santos-Sanches, C. L. Vilela. 2005. Antimicrobial Resistance Phenotypes and Genotypes of Streptococci isolated from Bovine Subclinical Mastitis. Congresso Nacional MICRO'05-BIOTEC'05. Póvoa do Varzim, Portugal. November 30 – December 3, 2005. (<http://www.microbiotec2005.info/>).

ANEXO 2. Artigo submetido para publicação:

Rato M., Bexiga R., Nunes S. F., Cavaco L. M, Vilela C. L., Santos-Sanches I. Molecular Epidemiology and population structure of bovine *Streptococcus uberis* isolates from Portuguese dairy farms. Appl. Environ. Microbiol. AEM00788-06.

ANEXO 3. Plano de trabalho para a Tese de Doutorado:

“Epidemiological characterization, antimicrobial resistance and virulence mechanisms of animal and human streptococci”

“Caracterização epidemiológica, mecanismos de resistência a antimicrobianos e virulência em espécies de *Streptococcus* em infecção animal e humana”